Untersuchungen zur Bedeutung von HB9 für die Entstehung Translokation t(7;12)-positiver akuter myeloischer Leukämie im Kindesalter

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Deborah Ingenhag
aus Köln

Düsseldorf, Januar 2017

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

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

Referent: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Ko-Referent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V
Abbildungsverzeichnis VIII
Tabellenverzeichnis X
Zusammenfassung XI
Summary XII

1. Einleitung 1
1.1 Die Hämatopoese 1
1.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle und ihre Nische 3
1.2 Leukämie 5
1.3 Die akute myeloische Leukämie 5
1.3.1 Die leukämische Stammzelle 6
1.3.2 Genetische Veränderungen in der AML 8
1.3.3 Klassifikation und Prognose 9
1.4 Translokation t(7;12)-positive AML 11
1.5 *HLXB9* kodiert für das Homöoprotein HB9 13
1.5.1 Gen- und Proteinstruktur 13
1.5.2 Physiologische Expression und Funktion von HB9 15
1.5.3 Deregulierte HB9-Expression in Erkrankungen 16
1.6 Bedeutung von HB9 in der Translokation t(7;12)-vermittelten Leukämogenese 17

2 Ziele der Arbeit 18

3 Methoden 19
3.1 Material 19
3.2 Molekularbiologische Methoden 19
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien 19
3.2.2 Transformation von *E. coli* und Bakterienkultur 19
3.2.3 Plasmidisolation 20
3.2.4 Restriktionsverdau 20
3.2.5 Agarose-Gelektrophorese und Gelelution von DNA-Fragmenten 20
3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten 21
3.2.7 Polymerasekettenreaktion 21
3.2.7.1 Sybr Green und Sonden basierte quantitative Real-Time PCR 22

3.2.7.2 Sonden-basierte Multiplex-qRT-PCR 24
3.2.7.3 Primer/Sonden-Design und Überprüfung der Produktspezifität 24
3.2.8 Sequenzierung von DNA-Fragmenten 25
3.2.9 Isolierung von RNA 26
3.2.10 Isolierung von genomischer DNA 26
3.2.11 Synthese von copyDNA 26
3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 27
3.2.13 Genexpressionsanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung (RNAseq) 27
3.2.13.1 RNAseq - Libraryherstellung 27
3.2.13.2 Bioinformatische Auswertung der RNAseq-Daten 28
3.2.14 Herstellung von Gesamtzelllysaten 28
3.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot 28
3.3 Zellkultur Techniken 29
3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien 29
3.3.2 Kryokonservierung 30
3.3.3 Präparation von murinen Knochenmarkszellen 30
3.3.4 Anreicherung und Kultivierung von murinen HSPZ 30
3.3.5 Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem Nabelschnurblut 31
3.3.6 Anreicherung und Kultivierung humaner $CD34^+$ HSPZ 33
3.3.7 Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel 33
3.3.8 Titration zur Ermittlung der Infektiösität pseudo-lentiviraler Partikel 35
3.3.9 Transduktion von murinen und humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen 35
3.3.10 Transduktion von Zelllinien 36
3.3.11 Transfektion von siRNA 36
3.3.12 Fluoreszenz-basierte analytische Durchflusszytometrie (FACS) 37
3.3.12.1 Analyse von Oberflächenantigenen 37
3.3.12.2 Zellzyklus-Analyse 38
3.3.12.3 Zelltodanalyse mittels Annexin und 7-AAD 39
3.3.12.4 FACS-Sorting 39
3.3.13 Immunfärbung 39
3.3.14 Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase Färbung 40
3.3.15 ATRA-induzierte Differenzierung von HL-60 40
3.3.16 Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität 40
3.3.17 *Screening* von Wirkstoff-Bibliotheken 41
3.4 Murines Transplantationsmodel 42
3.4.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in Empfängertiere 42
3.4.2 Haltung transplantierter Tiere 42

3.4.3 Blutabnahme 43
3.4.4 Präparation von murinen Blutzellen für die FACS-Analyse 43
3.4.5 Euthanasie der Versuchstiere, Organentnahme und Zellisolation 44
3.5 Statistik 44

4 Ergebnisse 45
4.1 Einfluss von HB9 auf das Expressionsprofil CD34$^+$ HSPZ 45
4.1.1 Funktioneller Nachweis der lentiviralen Expressionskonstrukte 45
4.1.2 Gewinnung CD34$^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut 46
4.1.3 Lentivirale Transduktion CD34$^+$ HSPZ 47
4.1.4 Expressionsanalyse mittels RNAseq 48
4.2 Untersuchungen zum Einfluss von HB9 auf die Zellphysiologie 55
4.2.1 Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus 55
4.2.2 Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie 58
4.2.3 Einfluss von HB9 auf den p53/p21-Signalweg 60
4.3 Untersuchung zum Einfluss von HB9 auf die Hämatopoese *in vivo* 64
4.4 Untersuchung möglicher HB9-gerichteter Therapieansätze 75
4.4.1 Charakterisierung des HL60[HB9] Zellmodells 75
4.4.2 Untersuchung von ATRA zur Behandlung HB9 exprimierender AML 78
4.4.3 Wirkstoff-*Screening* zur Behandlung HB9-positiver AML 82

5 Diskussion 85
5.1 Einfluss von HB9 auf das Genexpressionsprofil CD34$^+$ HSPZ 85
5.1.1 HB9 reduziert die Expression von *PTGER2* und *HPGD* in CD34$^+$ HSPZ 86
5.2 HB9 führt zum Zellzyklusarrest und induziert Seneszenz 89
5.3 HB9 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung *in vivo* 91
5.4 Evaluation neuer Wirkstoffe zur Behandlung HB9 exprimierender AML 93
5.4.1 HB9$^+$ Zellen zeigen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber ATRA 94
5.4.2 ABT-199 ist ein möglicher Kandidat zur Behandlung HB9$^+$ AML 95
5.5 Fazit 97

6 Literaturverzeichnis 98

7 Anhang 107
7.1 Materialien 107
7.1.1 Verwendete Mausstämme 107
7.1.2 Nabelschnurblut 107

7.1.3 Verwendete Zelllinien 107
7.1.4 Bakterien 107
7.1.5 Chemikalien und Reagenzien 108
7.1.6 Pro- und eukaryotische Nährmedien 108
7.1.7 Plasmide 109
7.1.8 Verwendete Oligonukleotide, Sonden und siRNAs 110
7.1.9 Enzyme und enzymatische Kits 111
7.1.10 Antikörper 111
7.1.11 FACS-Antikörper und *Gating* 112
7.1.12 Zellbiologische Kits 114
7.1.13 Molekularbiologische Kits 115
7.1.14 Verwendete Programme und Datenbanken 115
7.1.15 Puffer 116
7.1.16 Geräte 117
7.1.17 Sequenz HB9-T2A-GFP 118

Eigene Veröffentlichungen XIII
Kongressbeiträge XIV
Lebenslauf XV
Eidesstattliche Erklärung XVI
Danksagung XVII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AGM-Region	Aorta-Gonaden-Mesonephros Region
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-*trans* Retinsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Seralbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR-Zellen	*CXCL12- Abundant Reticular*-Zellen
CBF	*Core Binding Factor*
CD	*Cluster of differentiation*
cDNA	*komplementäre Desoxyribonukleinsäure*
Chr.	Chromosom
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CLP	*Common Lymphoid Progenitor*
CMP	*Common Myeloid Progenitor*
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
deion. H2O	deionisiertes Wasser/Nuklease-frei
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1	*Elongation factor 1-alpha* 1 Promotor
FAB	*French-American-British*
FACS	*Fluorescent Activated Cell Sort*
FKS	fötales Kälberserum
FC	*fold change*
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
FSC	*Forward-scattered light*
g	relative Erdbeschleunigung
GMP	Granulozyten/Makrophagen Progenitor
GO	*Gene Ontology*
GSEA	*Gene Set Enrichment Analysis*
Gy	Gray
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase (*horseraddish-peroxidase)*

HSPZ	Hämatopoetische Stamm-/Progenitor-Zelle(n)
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle(n)
IR	ionisierende Strahlung (*ionizing radiation*)
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
KO	*knockout*
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lin^-	Lineage negativ
LSK	$Lineage^-Sca\text{-}1^+c\text{-}Kit^+$
LSZ	Leukämische Stammzelle
LT-HSZ	*Long Term*-HSZ
M	Molar
MACS	*Magnetic Activated Cell Sort*
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor
min.	Minute
MOI	*multiplicity of infection*
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	Multipotenter Progenitor
n.s.	nicht signifikant
NES	*Normalized Enrichment Score*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
P/S	Penicillin/Streptomycin
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphat gepufferte Salinelösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidiumiodid
Puro	Puromycin
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
RARE	*Retinoic acid response element*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
siRNA	*small interfering* RNA
SSC	*Side-scattered light*
ST-HSZ	*Short Term*-HSZ
Tab.	Tabelle

TBS	Tris-gepufferte Saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDG	*Uracil-DNA Glycosylase*
V	Volt
vs	versus
WHO	*World Health Organization*
WT	Wildtyp
β-Gal	β-Galaktosidase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Hierarchie der Hämatopoese. 2
Abb. 2: Die hämatopoetische Stammzellnische. 4
Abb. 3: Schematische Darstellung der HB9 Gen- und Proteinstruktur. 13
Abb. 4: Vergleich der humanen und murinen Proteinsequenz von HB9. 14
Abb. 5: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut. 32
Abb. 6: FACS-Analyse von murinem peripherem Blut. 37
Abb. 7: Zellzyklusanalyse mittels FACS. 38
Abb. 8: Funktionsnachweis der lentiviralen Konstrukte. 46
Abb. 9: Immunmagnetische Anreicherung von $CD34^+$ HSPZ. 47
Abb. 10: Transduktion $CD34^+$ HSPZ. 48
Abb. 11: Hierarchische Cluster-Analyse der durch HB9 differentiell regulierten Gene in $CD34^+$ HSPZ. 49
Abb. 12: Netzwerkdarstellung der GO-Term Analyse von CD34[HB9]. 52
Abb. 13: qRT-PCR Validierung der verringerten Expression von *HPGD* und *PTGER2* in CD34[HB9]. 54
Abb. 14: Funktionsnachweis der lentiviralen Konstrukte in HT1080 und NIH3T3. 55
Abb. 15: Proliferationsanalyse HB9 transduzierter HT1080 und NIH3T3 Zellen. 56
Abb. 16: Analyse zum Einfluss von HB9 auf den Zellzyklus. 57
Abb. 17: Untersuchung zum Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie. 58
Abb. 18: Seneszenz-spezifische β-Galaktosidase Färbung. 59
Abb. 19: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie. 60
Abb. 20: Westernblot-Analyse zum Einfluss von HB9 auf die Aktivierung des p53/p21 Signalweges. 61
Abb. 21: Westernblot Analyse zum Nachweis des siRNA vermittelten *Knockdowns* von p53 62
Abb. 22: Untersuchungen zum Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus unter p53 *Knockdown*. 63
Abb. 23: *Lineage* Depletion zur Anreicherung von HSPZ aus murinem Knochenmark. 64
Abb. 24: Transduktion muriner Lin^- HSPZ. 65
Abb. 25: Nachweis der HB9-Expression in Lin[HB9]. 66
Abb. 26: Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution in B6[GFP] und B6[HB9]. 66
Abb. 27: GFP-Nachweis im peripheren Blut von B6[GFP] und B6[HB9] Mäusen. 67
Abb. 28: Nachweis der genomischen Integration und Expression der Transgene im peripheren Blut von B6[GFP] und B6[HB9]. 68

Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der zellulären Zusammensetzung des peripheren Blutes von B6[GFP] und B6[HB9]. 69
Abb. 30: FACS-Analyse der GFP-Expression in hämatopoetischen Organen von B6[GFP] und B6[HB9]. 70
Abb. 31: Untersuchung zur zellulären Zusammensetzung hämatopoetischer Organe von B6[GFP] und B6[HB9]. 71
Abb. 32: Untersuchung des hämatopoetischen Stammzellkompartiments in B6[GFP] und B6[HB9]. . 72
Abb. 33: Analyse lymphoider und myeloider Progenitoren in B6[GFP] und B6[HB9]. 74
Abb. 34: Nachweis der Transgen-Expression in HL-60 Zellen. 75
Abb. 35: Proliferationsanalyse von HL-60 Zellen nach Transduktion von HB9. 76
Abb. 36: Zellzyklusanalyse von HL60[HB9] und HL60[GFP]. 77
Abb. 37: Zellzyklusanalyse von HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP] über einen Zeitraum von zwei bis sechs Wochen nach Transduktion. 77
Abb. 38: Zellzyklusanalyse stabil mit HB9 transfizierter HL-60 Zellen. 78
Abb. 39: Testung verschiedener ATRA-Konzentrationen zur Induktion der CD11b-Expression. 79
Abb. 40: ATRA-induzierte Differenzierung von HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. 80
Abb. 41: Zellzyklusanalyse von HL60[GFP] und HL60[HB9] nach ATRA-Behandlung. 81
Abb. 42: Messung der ATRA-induzierten Apoptose in HL60[GFP] und HL60[HB9]. 82
Abb. 43: Screening klinisch relevanter Wirkstoffe auf HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. 83
Abb. 44: Untersuchung zur Expression von BCL-2 in HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. 84
Abb. 45: qRT-PCR zur Validierung der verringerten Expression von *PTGER2* und *HPGD* in HL60[HB9]. 88
Abb. 46: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pCDH-EF1-T2A-GFP. 109

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML. 9
Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML und verwandter myeloider Neoplasien. 10
Tab. 3: Pipettierschema einer PCR mit Taq-Polymerase. 21
Tab. 4: Amplifikationsprotokoll einer PCR mit Taq-Polymerase. 21
Tab. 5: Pipettierschema einer PCR mit Phusion-Polymerase. 22
Tab. 6: Amplifikationsprotokoll einer PCR mit Phusion-Polymerase. 22
Tab. 7: Pipettierschema einer SybrGreen-basierten qRT-PCR. 22
Tab. 8: Amplifikationsprotokoll einer SybrGreen-basierten qRT-PCR. 23
Tab. 9: Pipettierschema einer Sonden-basierten qRT-PCR. 23
Tab. 10: Amplifikationsprotokoll einer Sonden-basierten qRT-PCR. 24
Tab. 11: Pipettierschema einer Sonden-basierten Multiplex qRT-PCR. 24
Tab. 12: Pipettierschema einer Sequenzierreaktion. 25
Tab. 13: Temperaturprotokoll einer Sequenzierreaktion. 25
Tab. 14: Temperaturprotokoll einer Sequenzierreaktion bei hohem GC-Gehalt. 25
Tab. 15: Eingesetzte Plasmidmengen zur Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel. 34
Tab. 16: Liste der durch HB9 in $CD34^+$ HSPZ differentiell regulierten Gene. 51
Tab. 17: Liste der durch HB9 in $CD34^+$ HSPZ differentiell regulierten GO-Terms. 53
Tab. 18: Übereinstimmend in $CD34^+$ HSPZ und HL-60 durch HB9 differentiell regulierte Gene. 88

Zusammenfassung

Die Translokation t(7;12)-positive AML ist eine äußerst aggressive Leukämie im Säuglingsalter. In etwa der Hälfte der Patienten resultiert die Translokation in einem Fusionstranskript der Gene *HB9* und *ETV6*. Allen Patienten hingegen gemein ist eine ektope Expression von HB9 ausgehend von dem Wildtyp Allel, welche als Leukämie-initiierender Faktor dieser Leukämieentität postuliert wird.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von HB9 im Rahmen der Hämatopoese ein onkogenes Potential aufweist. Genexpressionsstudien in HB9 transduzierten $CD34^+$ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) resultierten in einer Anreicherung von Zellzyklus-, sowie Mitose-bezogenen GO-Terms. *In vitro* Analysen im humanen und murinen Zelllinienmodell zeigten, dass die Expression von HB9 zum Proliferationsarrest der Zellen in der G1 und der G2/M-Phase führte. *Knockdown* Experimente bestätigten, dass der durch HB9 induzierte Proliferationsarrest über den p53/p21-Signalweg vermittelt wird. Der Proliferationsarrest in Verbindung mit dem Nachweis mehrkerniger, abgeflachter β-$Galaktosidase^+$ Zellen zeigte, dass HB9 zur Auslösung prämaturer Seneszenz führen kann. Die Induktion prämaturer Seneszenz, als Tumor-suppressiver Mechanismus, ist ein eindeutiger Hinweis auf das onkogene Potential von HB9.

In vivo wurde ein onkogener Einfluss von HB9 auf die Hämatopoese untersucht, indem HB9-GFP transduzierte murine HSPZ in myeloablativ bestrahlte Empfängertiere transplantiert und die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems analysiert wurde. HB9-GFP^+ Zellen konnten nur im Stamm- und Progenitorzellpool, nicht aber im maturen Zellpool nachgewiesen werden, wodurch auf einen Differenzierungs- oder Proliferationsarrest geschlossen werden kann. Innerhalb des Progenitorkompartiments konnten mehr HB9-GFP^+ Zellen der myeloiden, speziell der megakaryozytären/erythrozytären, als der lymphoiden Zellreihe zugeordnet werden, kongruent zu dem exklusiven Auftreten der Translokation t(7;12) in myeloischen Leukämien. Abschließend wurde die Sensitivität HB9-exprimierender Zellen gegenüber 273 klinisch relevanten Wirkstoffen in einem HL-60 Zelllinienmodell untersucht und identifizierte ABT-199, sowie ATRA als mögliche Kandidaten zur HB9-gerichteten Therapie Translokation t(7;12)-positiver AML.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass HB9 über ein onkogenes Potential verfügt, die Differenzierung hämatopoetischer Zellen *in vivo* beeinflusst und legt zudem die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur Behandlung Translokation t(7;12)-positiver AML.

Summary

Translocation t(7;12)-positive AML is a very aggressive infant leukemia. In approximately 50 % of the patients, a fusion transcript of the *HB9* and *ETV6* gene is detected as result of the translocation. However, all patients in common is an ectopic expression of the *HB9* wildtype allele, which is assumed to be the leukemia-initiating factor.

In this thesis I investigated, whether the expression of HB9 has an oncogenic potential on hematopoiesis. Gene expression studies in HB9 transduced $CD34^+$ hematopoietic stem- and progenitor cells (HSPC) led to an enrichment of cell cycle- and mitosis- related GO-terms. *In vitro* analysis in a human and murine cell line model revealed, that expression of HB9 resulted in a proliferative arrest, stalling the cells in either G1- or G2/M-phase of the cell cycle. HB9 induced proliferative arrest was dependent on p53/p21-signaling, as p53 knockdown was able to prevent the arrest.

The accumulation of multinuclear and flattened cells, showing an increased β-galactosidase activity, together with the proliferative arrest, indicates that HB9 expression led to premature senescence. Onset of premature senescence, as a tumour-suppressive mechanism, points clearly towards an oncogenic potential of HB9.

To clarify whether HB9 leads to an oncogenic deregulation of hematopoiesis *in vivo*, HB9-GFP transduced murine HSPC were transplanted into myeloablative irradiated recipient mice, followed by analysis of hematopoietic reconstitution. HB9-GFP^+ cells were only detectable in the stem cell/ progenitor compartment and did not contribute to the mature cell pool, indicating a proliferative or differentiation arrest. Within the progenitor compartment HB9-GFP^+ cells were primarily found in myeloid, particularly in megakaryocyte/erythrocyte, instead of lymphoid progenitors, in accordance to the exclusive occurrence of translocation t(7;12) in myeloid leukemia.

An HB9 expressing HL-60 cell line model was used for screening of sensitivity towards a library of 273 clinically relevant compounds, revealing ABT-199 and ATRA as potential candidates for HB9-targeted therapies.

In summary, this thesis showed, that HB9 bears an oncogenic potential, influences the hematopoietic differentiation *in vivo* and serves as a basis for the development of new therapeutic targets for the treatment of translocation t(7;12)-positive AML.

1. Einleitung

1.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese bezeichnet die Blutbildung und ist ein hochkonservierter Prozess in der Evolution der Vertebraten [1]. Die meisten Blutzellen haben nur eine relativ kurze Lebensdauer von wenigen Tagen bis Wochen und müssen daher ständig erneuert werden, so dass das Blut eines der Gewebe mit dem höchsten Selbsterneuerungpotential ist [1].

Ort der Hämatopoese ist das Knochenmark. Hier werden ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) alle Blutzellen gebildet (Abb. 1) [2].

Über asymmetrische Zellteilung ist die HSZ in der Lage, sich selbst zu erneuern und so ihren Stammzellcharakter zu erhalten und gleichzeitig Vorläuferzellen zu bilden, die in jede Zellreihe des Blutes differenzieren können [3]. Es wird zwischen *Long-Term* (LT)-HSZ, die über lebenslängliches Selbsterneuerungspotential verfügen, und *Short-Term* (ST)-HSZ, deren Selbsterneuerungpotential zeitlich begrenzt ist, unterschieden [4]. Ausgehend von den ST-HSZ entstehen multipotente Progenitorzellen (MPP), die in jede Zellreihe differenzieren können, jedoch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben [5].

Die MPPs differenzieren zu oligopotenten Progenitoren, wie dem *common lymphoid progenitor* (CLP) und dem *common myeloid progenitor* (CMP), die den Ausgangspunkt der lymphoiden beziehungsweise myeloiden Zellreihe darstellen [6, 7]. Aus dem CLP entstehen über weitere Progenitorstufen die T- und B-Lymphozyten, sowie die NK-Zellen. Aus dem CMP entsteht der Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor (MEP) und der Granulozyten/Makrophagen Progenitor (GMP). MEPs differenzieren weiter zu Megakaryozyten/Thrombozyten und Erythrozyten, während GMPs zu Monozyten/Makrophagen und Granulozyten differenzieren [7]. Dendritische Zellen können sowohl aus der myeloiden als auch aus der lymphoiden Zellreihe hervorgehen [8, 9].

Während die Ausdifferenzierung myeloider Zellen hauptsächlich im Knochenmark stattfindet, müssen lymphoide Zellen das Knochenmark verlassen und in spezifische periphere lymphatische Organe, wie Milz und Thymus, migrieren, um ihre Differenzierung zu vollenden [10].

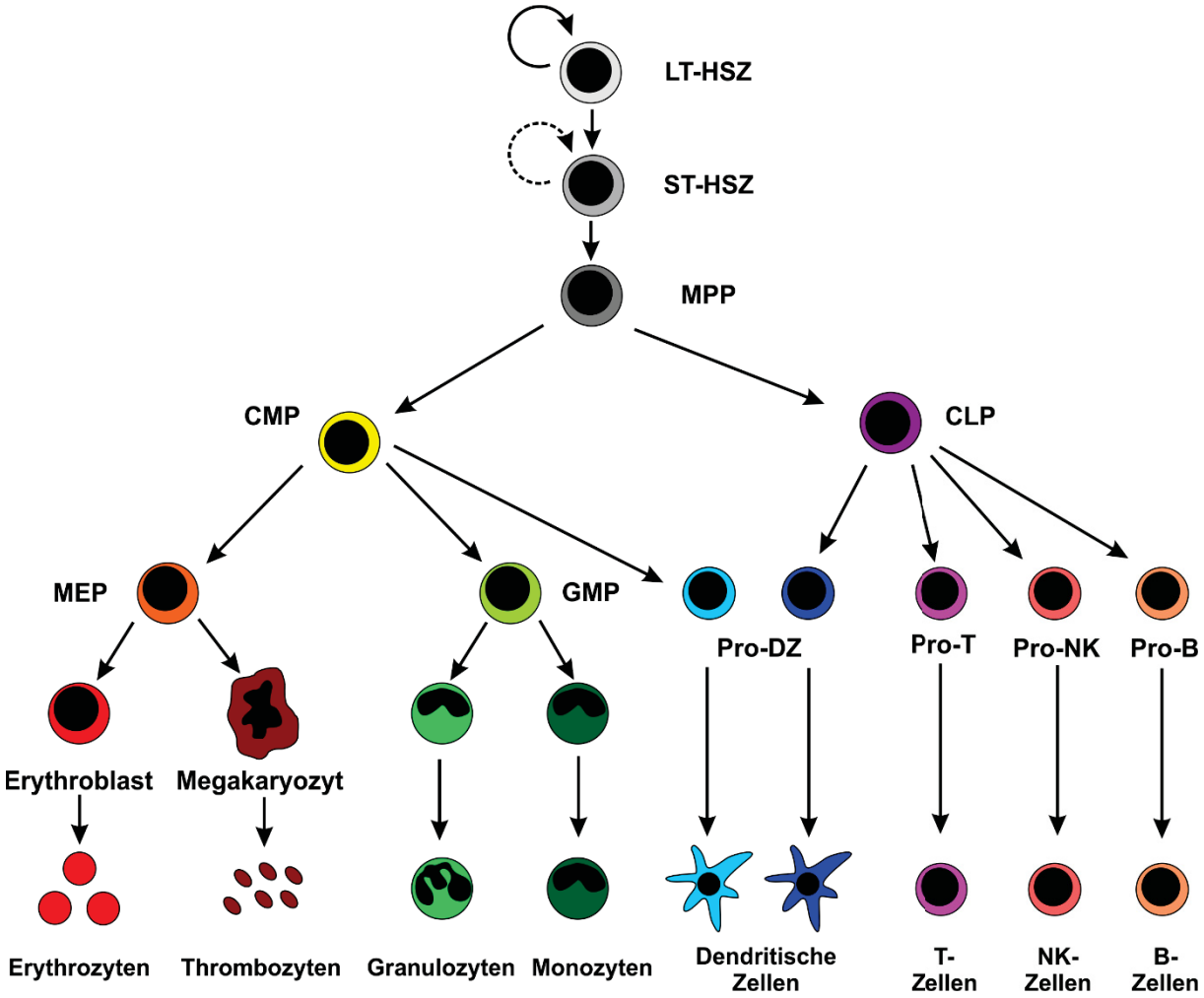

Abb. 1: Die Hierarchie der Hämatopoese. Ausgehend von der LT-/ST-HSZ entstehen multipotente Progenitorzellen (MPP), aus denen sich die Zellen der myeloiden und lymphoiden Zellreihe entwickeln. An der Spitze der myeloiden Zellreihe steht der *common myeloid progenitor* (CMP), aus dem der Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor (MEP) und der Granulozyten/Monozyten Progenitor (GMP) hervorgeht. MEPs differenzieren weiter zu Megakaryozyten/Thrombozyten und Erythrozyten, während GMPs zu Monozyten/Makrophagen und Granulozyten differenzieren. An der Spitze der lymphoiden Zellreihe steht der *common lymphoid progenitor* (CLP), aus dem über weitere Vorläuferzellen T-, B- und NK-Zellen entstehen. Dendritische Zellen (DZ) können sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Progenitoren hervorgehen.

Die Charakterisierung der einzelnen Progenitorstufen wurde durch die fluoreszenzbasierte durchflusszytometrische Sortierung der Zellen (FACS) anhand ihrer Oberflächenmarker, gefolgt von funktionalen Tests in Bezug auf Selbsterneuerung, Klonalität und Differenzierungspotential, ermöglicht. Während sich das Differenzierungspotential von Progenitorzellen sehr gut *in vitro* untersuchen lässt, so lässt sich das Stammzellpotential einer Zelle, in Form von lebenslanger Selbsterneuerung und Differenzierung in alle Zellreihen, nur *in vivo* nachweisen [11]. In Bezug darauf, bietet die Maus als Modellorganismus, das heutzutage am besten charakterisierte hämatopoetische System. Trotz der hohen Übereinstimmung in den Differenzierungsreihen und Funktionen der Zelltypen, unterscheiden

sich humane und murine hämatopoetische Zellen in den Oberflächenantigenen, welche die jeweiligen Zellpopulationen definieren. Beispielsweise werden murine HSZ definiert als *Lineage-negative* (Lin^-), Sca-1^+, c-Kit^+ (LSK)-Zellen, innerhalb derer die LT-HSZ weiter definiert werden als CD34 negativ [12]. Im humanen System hingegen liegt das Langzeit-Rekonstitutionspotential in den CD34 positiven HSZ, innerhalb der Lin^-CD38^- Zellpopulation [13].

1.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle und ihre Nische

Erste Hinweise auf die Existenz hämatopoetischer Stammzellen kamen bereits 1961 durch die Arbeit von Till und McCulloch auf, die zeigte, dass aus einzelnen Knochenmarkszellen Progenitoren unterschiedlicher Zellreihen hervorgehen [14, 15]. Heutzutage stellen HSZ, basierend auf ihrer einfachen Isolierbarkeit über FACS-Sortierung anhand von Oberflächenantigenen, die am besten charakterisierten somatischen Stammzellen dar.

HSZ entstehen während der Embryonalentwicklung *de novo* in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) Region und der Plazenta, von wo aus sie in die fötale Leber migrieren und expandieren [1]. Zum Zeitpunkt der Geburt migriert die HSZ aktiv ins Knochenmark und verbleibt dort über Ihre gesamte Lebensdauer. Das so genannte *Homing* der HSZ erfolgt über Attraktion des Chemokins *Stroma Derived Factor 1α* (SDF-1α), welches von Stromazellen im Knochenmark produziert wird und an den Oberflächenrezeptor *C-X-C Chemokine Receptor type 4* (CXCR-4) auf der HSZ bindet [16].

Die während der Embryonalentwicklung gebildeten Zellen stellen den gesamten Pool an HSZ dar, der zeitlebens für die Produktion aller Blutzellen zur Verfügung steht. Da täglich Millionen von Blutzellen ersetzt werden, müssen sich die HSZ zu ihrer Erhaltung immer wieder selbst-erneuern, um über die gesamte Lebensdauer des Organismus hinweg die Produktion der Blutzellen sicherzustellen [17]. Allein die Fähigkeit zur Selbsterneuerung reicht jedoch nicht aus, um das hämatopoetische System lebenslang aufrecht zu erhalten, da anhaltend zyklierende Zellen über einen solchen Zeitraum einen zu großen DNA-Schaden akkumulieren würden [18]. Die meisten HSZ befinden sich daher in einem quieszenten Zustand, in dem sie sich nur sehr selten teilen und so vor DNA-schädigenden Einflüssen geschützt werden. Unter homöostatischen Bedingungen befinden sich 90-95 % aller HSZ in diesem quieszenten Stadium und teilen sich nur etwa alle 145 Tage, während die aktiven 5-10 % aller HSZ sich ungefähr alle 36 Tage teilen [19]. Neben der Selbsterneuerung stellt die Quieszenz den wichtigsten Mechanismus zur Aufrechterhaltung des HSZ Pools und damit der Hämatopoese dar. Die

Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung, von Quieszenz und Proliferation ist grundlegend für eine gesunde Hämatopoese. Maßgeblich für diesen streng kontrollierten Regulationsprozess ist die direkte Umgebung der HSZ, die so genannte HSZ Nische [20].
Die HSZ Nische ist eine Region im Knochenmark, die unter Beteiligung verschiedener funktionaler Zelltypen und Signalmechanismen, das Stammzellpotential der HSZ aufrechterhält und ihr Verhalten unter homöostatischen, sowie Stress- Bedingungen steuert (Abb. 2).

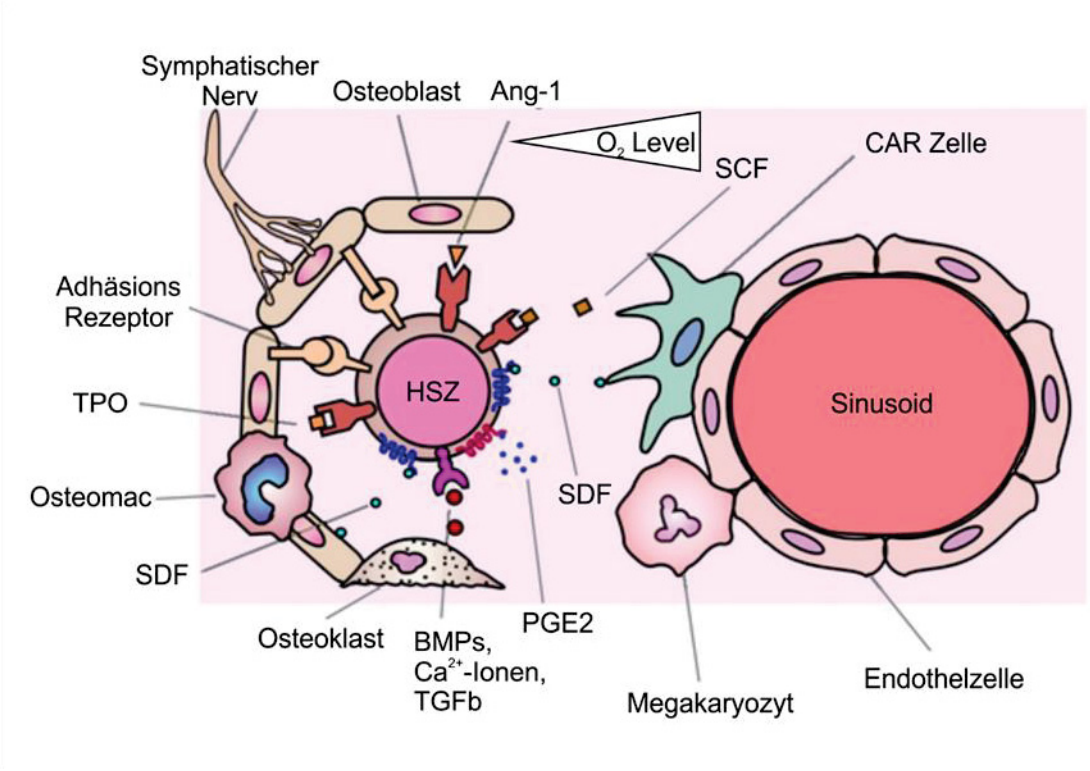

Abb. 2: Die hämatopoetische Stammzellnische. Innerhalb des Knochenmarks sind die HSZ in bestimmten Nischen-Regionen lokalisiert, wie dem Endosteum, und perivaskulär, in direkter Nähe zu kleinen Blutgefäßen (Sinusoiden), die das Stammzellpotential der HSZ aufrechterhalten und exogene Signale weiterleiten. An der Interaktion sind verschiedene Zelltypen beteiligt, die entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt oder die Ausschüttung von Zytokinen und hormonellen Botenstoffen mit der HSZ kommunizieren. (Adaptiert nach [21])**.**

Lokalisiert wurde die HSZ Nische an der Innenseite des Knochens, dem Endosteum [22], ebenso wie perivaskulär, in direkter Nähe zu kleinen Blutgefäßen/Sinusoiden [23, 24]. An dem Aufbau der Nische sind je nach Lokalisation verschiedene Zelltypen beteiligt. Zur Nische des Endosteums gehören unter anderem Osteoblasten und Osteoklasten, die am Knochen-Aufbau und -Abbau beteiligt sind, sowie gewebsspezifische Makrophagen (Osteomacs), welche die Funktion der Osteoblasten steuern. Zu der perivaskulären Nische gehören sinusoidale Endothelzellen, welche die Blutgefäßinnenseite säumen, sowie *CXCL12-Abundant Reticular* (CAR)-Zellen, die große Mengen des Chemokins CXCL12/SDF1α produzieren [21].

Über die Interaktion mit den spezialisierten Zelltypen der Nische wird die HSZ von außen beeinflusst. Die Interaktion wird über direkten Zell-Zell-Kontakt, beispielsweise durch β1-Integrine, extrazelluläre Matrix und Notch Rezeptoren, sowie durch Bindung sekretierter Zytokine, wie *Stem Cell Factor* (SCF), Thrombopoetin (TPO) und Angiopoetin (ANG-1), an ihre entsprechenden Oberflächenrezeptoren auf der HSZ, vermittelt [25]. Hinzu kommen hormonelle Botenstoffe wie Prostaglandin E2 (PGE2) und die Ausbildung chemischer Gradienten (Ca^{2+}, O_2). Über diese Interaktionen wird die Lokalisation der HSZ, sowie das Gleichgewicht von Quieszenz und Proliferation moduliert [25]. Infolge einer Deregulation dieses Gleichgewichts kann es zur Entstehung von neoplastischen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems kommen.

1.2 Leukämie

Die Leukämie ist eine neoplastische Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Es kommt zur unkontrollierten Vermehrung undifferenzierter Vorläuferzellen (Blasten), welche die physiologische Hämatopoese verdrängen beziehungsweise unterdrücken.
Mit einem Anteil von 30,6 % ist die Leukämie die häufigste Krebserkrankung, die im Kindesalter (< 18 Jahre) auftritt [26].
Die leukämischen Blasten werden anhand von Morphologie und Oberflächenmarkern ihrem zellulären Ursprung zugeordnet. Je nachdem ob die Blasten der lymphoiden oder myeloiden Zellreihe entstammen, spricht man von einer lymphatischen oder einer myeloischen Leukämie.

1.3 Die akute myeloische Leukämie

Im Rahmen der akuten myeloischen Leukämie (AML) kommt es zur Expansion von Blasten, die der myeloiden Zellreihe entstammen.
Mit einem Anteil von 15 % an den kindlichen Leukämien kommt die AML weitaus seltener vor als die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit einem Anteil von 80 % [27], ist jedoch schlechter therapierbar. Aufgrund dessen liegt die Überlebensrate fünf Jahre nach Diagnose bei nur 64 %, während ALL-Patienten mit bis zu 90 % eine deutlich höhere Überlebensrate aufweisen [28].
Die Ursachen für die Entstehung einer AML sind weitestgehend unbekannt, jedoch können äußere Einflüsse, wie die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung oder Chemikalien, wie Benzolen und Zytostatika, die AML-Entstehung begünstigen [29]. Ein von Geburt an

gesteigertes Risiko eine AML zu entwickeln besteht bei Menschen mit kongenitalen Syndromen, die einen Defekt in DNA-Reparatur Mechanismen aufweisen, wie der Fanconi Anämie, sowie bei Syndromen, die durch Aneuploidie entstehen, beispielsweise dem Down-Syndrom [30]. Während der AML im Erwachsenenalter häufig präleukämische myeloproliferative Erkrankungen (MDS) vorangehen, so entsteht die AML im Kindesalter meist *de novo*.

Trotz intensiver chemotherapeutischer Behandlung erleiden etwa 30 % der pädiatrischen Patienten ein Rezidiv. Die Prognose dieser Patienten ist mit einer Überlebensrate von nur ~30 % deutlich schlechter als bei Erstdiagnose [31].

Bei Patienten, deren Prognose mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht, erwägt man daher die Durchführung einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation nach Erreichen der ersten Remission [32]. Als Hauptursache für das Auftreten von Rezidiven wird das Vorhandensein leukämischer Stammzellen angesehen, welche sich der konventionellen Chemotherapie, sowie Bestrahlung mit anschließender Stammzelltransplantation entziehen [33].

1.3.1 Die leukämische Stammzelle

Ebenso wie die normale ist auch die maligne Hämatopoese einer hierarchischen Struktur unterworfen, an deren Spitze nicht die hämatopoetische, sondern eine leukämische Stammzelle (LSZ) steht [34].

Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer LSZ kamen bereits in Studien der frühen 70er Jahre auf, die zeigten, dass nur wenige Zellen innerhalb einer leukämischen Zellpopulation dazu in der Lage sind *in vivo* und *in vitro* zu proliferieren [35, 36]. Den funktionellen Beweis lieferten Bonnet und Dick 1997, die die Zellen mehrerer AML-Patienten entsprechend den Oberflächenmarkern von humanen hämatopoetischen Stammzellen ($Lin^-CD34^+CD38^-$) und Progenitorzellen ($Lin^-CD34^+CD38^+$) sortierten und in immunsuppressive NOD/SCID-Mäuse transplantierten [37]. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass leukämische $CD34^+CD38^-$ LSZ nur zu einem geringen Prozentsatz (0,2-1 %) innerhalb der leukämischen Zellpopulation vorhanden waren und dass nur die Transplantation dieser Zellen und nicht die der $CD34^+CD38^+$ leukämischen Zellen zur AML Entstehung in den Mäusen führte [37].

Definiert wird die LSZ demzufolge über ihr Potential eine AML in einen anderen Organismus zu transferieren, einen Pool an Blasten zu generieren, der in seiner Heterogenität dem Initialtumor entspricht, sowie über ihr Selbsterneuerungspotential in seriellen

Transplantationen [38]. Es stellte sich heraus, dass ebenso wie die HSZ auch die LSZ in die Knochenmarksnische migriert und dort residiert [39]. Studien zeigten, dass eine Chemotherapie zwar zur Apoptose der von der LSZ entstandenen Blasten ($CD34^+CD38^+$) führte, die LSZ ($CD34^+CD38^-$) jedoch resistent gegenüber der Behandlung war und nachfolgend ein Rezidiv initiieren konnte [39]. Zellzyklusanalysen ergaben, dass sich die LSZ ebenso wie die HSZ in einem quieszenten Stadium befindet und so geschützt ist vor Therapien, deren zytotoxische Wirkung sich nur bei proliferierenden Zellen entfalten kann [39].

Man geht davon aus, dass die Existenz von LSZ der Hauptgrund für Therapieversagen und das Auftreten von Rezidiven in der Behandlung von AML ist [33]. Daher ist es das Ziel der aktuellen Forschung selektive Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um die LSZ zu eradizieren.

Angriffspunkte sind die Stammzelleigenschaften der LSZ, wie Quieszenz, Selbsterneuerung und Interaktion mit der Stammzellnische. Beispielsweise kann durch Behandlung mit CXCR4 Antikörpern das CXCR4-SDF1α vermittelte *Homing* der LSZ in die Knochenmarksnische gestört werden und führt so zu einem verringerten Überleben sowie *Engraftment* der AML Zellen [40, 41]. Das Selbsterneuerungspotential der LSZ wird angesteuert, indem man in die verantwortlichen Signalwege, wie den Notch-, Hedgehog- und kanonischen Wnt-Signalweg eingreift [42-44]. Weitere Ziele sind Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB [45, 46], sowie die Inhibition anti-apoptotischer Proteine der BCL-2 Familie, die in AML häufig hochreguliert sind [47, 48].

Neben den Stammzelleigenschaften der LSZ ist es ebenso wichtig Angriffspunkte zu finden, welche die leukämische von der hämatopoetischen Stammzelle unterscheiden, um toxische Nebeneffekte möglichst gering zu halten. Hier bieten sich Oberflächenmarker wie CD123, CD44 und CD32 an, die stärker auf LSZ als auf HSZ exprimiert werden [49]. Diese Oberflächenmarker werden zum Ziel von monoklonalen Antikörpern, Immuntoxinen, CAR (Chimärer-Antigen-Rezeptor)-T-Zellen, sowie Nanopartikel-Therapie. Des Weiteren werden genomweite Expressionsstudien an LSZ durchgeführt, um die Wirkungsweise bekannter gegen LSZ gerichteter Wirkstoffe detaillierter zu untersuchen und so über die Aufdeckung der Mechanismen neue Wirkstoffe zu postulieren, die in der Therapie eingesetzt werden könnten [50, 51].

1.3.2 Genetische Veränderungen in der AML

Für die Entstehung einer malignen Neoplasie gilt allgemein, dass diese nicht auf der Basis einer einzelnen Mutation beruht, sondern die Folge mehrerer genetischer Veränderungen ist, die in Kooperation zur Transformation der Zelle führen [52].

Diese genetischen Veränderungen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Die eine Kategorie (Typ I) umfasst genetische Veränderungen, die entweder die Proliferation oder das Überleben der Zelle begünstigen, die zweite Kategorie (Typ II) umfasst genetische Veränderungen, die die Differenzierung der Zelle beeinflussen [53].

Typ I genetische Veränderungen sind häufig aktivierende Mutationen von Genen, die an Signaltransduktion beteiligt sind, wie *FLT3, KIT, N-RAS, K-RAS* und *PTPN11* [53].

Typ II genetische Veränderungen betreffen zumeist hämatopoetische Transkriptionsfaktoren und treten häufig in Form von für die Leukämieentität charakteristischen chromosomalen Translokationen auf [53]. Durch die Translokation kommt es zu einer Änderung in der Funktion der Transkriptionsfaktoren. Hierbei kann man zwei verschiedene Mechanismen unterscheiden [54]: (1) Die kodierende Region des translozierten Gens bleibt vollständig erhalten, wird jedoch bedingt durch die Translokation der Kontrolle anderer regulatorischer Elemente unterworfen und infolgedessen dereguliert exprimiert [54]. Ein Beispiel hierfür ist die Translokation t(8;14)(q24;q32) beim Burkitt Lymphom, in Folge derer die Expression des *MYC* Gens der Kontrolle des IGH-*Enhancers* unterworfen wird [55]. Die gesteigerte Expression von MYC führt zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle.

(2) Die Translokation führt zu einem Bruch innerhalb der kodierenden Regionen der jeweiligen Translokationspartner, so dass es zur Bildung eines Fusionsgens kommt. Wird ein Fusionsprotein gebildet, so kann dieses ein unterschiedliches Expressionsverhalten, intrazelluläre Lokalisation, Regulation oder auch Aktivität aufweisen, verglichen zu den ursprünglichen Funktionen der Translokationspartner [54]. Ein Beispiel hierfür ist die Translokation t(15;17), bei der es zur Fusion der beiden Gene *Promyelocytic Leukemia Protein* (*PML)* und *Retinoic Acid Receptor α* (*RARα)* kommt, aus der das Fusionsprotein PML-RARα resultiert [56]. RARα reguliert abhängig von der Bindung seines Liganden die Transkription bestimmter Gene, die für die weitere Differenzierung der Zelle wichtig sind. Liegt der Retinsäurerezeptor fusioniert mit PML vor, kommt es zur dauerhaften Repression der nachgeschalteten Gene, in Folge derer die Differenzierung der Zelle arretiert [56].

Die häufigsten chromosomalen Aberrationen der kindlichen AML sind folgende Translokationen, bei denen es zur Bildung des jeweils genannten Fusionsgens kommt:

Translokation t(11q23)-*MLL* (18 %), t(15;17)-*PML/RARα* (12 %), t(8;21)-*RUNX1/RUNX1T* (12 %) und Inversion inv(16)-*CBFB-MYH11* (8 %) [57].

Translokation t(8;21)(q22;q22) und Inversion inv(16)(p13.1q22) werden zusammengefasst als *Core Binding Factor* (CBF)-AML, da in beiden Aberrationen die Untereinheiten des Transkriptionsfaktor-Komplexes CBF betroffen sind, wodurch die CBF-bedingte Transkription negativ dominant reguliert wird [58]. Bei Translokationen, die das *Mixed-Lineage Leukemia 1* (*MLL1*) Gen betreffen, kommt es zur Fusion des Amino-Terminus der Histon Methyltransferase MLL1 mit verschiedenen Fusionspartnern, wodurch es zu einer aberranten epigenetischen Regulation von Zielgenen wie *MEIS1* und Mitgliedern der *HOXA*-Genfamilie kommt [59]. Die dadurch gesteigerte Expression dieser Gene führt zu einem erhöhten Stammzellpotential der Zelle.

1.3.3 Klassifikation und Prognose

Die spezifische Klassifikation der AML ist von immenser Bedeutung für die Prognose und die sich daran orientierende Intensität der Behandlung [60]. Das frühere *French-American-British* (FAB)-Klassifikationssystem [61], welches für die Einteilung nur den Differenzierungsgrad der Blasten berücksichtigte, ausgehend von FAB-M0 bis hin zu FAB-M7 (Tab. 1), wird heutzutage durch die Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) ersetzt (Tab. 2), welche zusätzlich die häufigsten genetischen Veränderungen mit einbezieht (vgl. 1.3.2) [62].

Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML. [61].

FAB-Subtyp	Bezeichnung
M0	undifferenzierte Myeloblastenleukämie
M1	Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung
M2	Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M3V	hypogranulierte Variante
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	mit pathologischen Eosinophilen
M5	Akute monozytäre Leukämie
M5A	Akute Monoblastenleukämie
M5b	Akute Monozytenleukämie
M6	Akute Erythroblastenleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Die Klassifikation ist ein wichtiges Kriterium für die Prognosestellung. Patienten mit CBF-AML haben generell eine gute Prognose [63], während die Prognose von Patienten mit *MLL1*-Aberrationen je nach Translokationspartner unterschiedlich ist [64, 65]. Patienten mit Translokation t(15;17)-*PML/RARα*-AML können sogar sehr gut behandelt werden. Die Gabe von all-*trans* Retinsäure (ATRA) in pharmakologischen Dosen führt zur Degradierung des PML-RARα Komplexes und so zur Re-Aktivierung der Transkription Retinsäure-abhängiger Gene. Infolgedessen kommt es zur Ausreifung und Apoptose der Blasten [66, 67]. In Kombination mit Chemotherapie kann die Behandlung mit ATRA zur Langzeit-Remission und sogar zur Heilung der betroffenen Patienten führen [66-68].

Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML und verwandter myeloider Neoplasien. [62].

WHO Klassifikation von AML und verwandten Neoplasien	
Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Veränderungen	AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
	APL mit t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*
	AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
	AML mit t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
	AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
	AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
	AML mit mutiertem *NPM1*
	AML mit biallelischen Mutationen von *CEBPA*
	Zwischenzeitliche Entität: AML mit *BCR-ABL1*
	Zwischenzeitliche Entität: AML mit mutiertem *RUNX1*
AML mit MDS-bezogenen Veränderungen	
Therapie-bedingte myeloide Neoplasien	
AML, nicht anderweitig spezifiziert	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Reifung
	AML mit Reifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie
	Reine erythrozytäre Leukämie
	Akute Megakaryoblasten-Leukämie
	Akute Basophilen-Leukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloides Sarkom	
Myeloide Proliferationen bei Down Syndrom	Transiente abnormale Myelopoese (TAM)
	Myeloische Leukämie verbunden mit Down Syndrom
Blastische plasmazytoide dendritische Zell Neoplasie	

Eine schlechte Prognose erhalten hingegen Patienten mit Aberrationen der Chromosomen 5 und 7, sowie der Translokation t(6;9). Die schlechteste Prognose weisen Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen auf, bei denen mehr als drei oder fünf chromosomale Veränderungen identifiziert werden [69-72].

1.4 Translokation t(7;12)-positive AML

Die Translokation t(7;12)(q36;p13) ist selten und tritt nur bei sehr jungen AML-Patienten (< 18 Monate) auf [73]. Innerhalb der jüngeren AML-Patienten tritt sie jedoch mit einer relativ hohen Inzidenz von bis zu 30 % auf und ist damit nach Aberrationen die das *MLL1*-Gen betreffen die zweithäufigste chromosomale Aberration bei AML im Säuglingsalter [74]. Trotz der hohen Inzidenz bei Säuglings-AML, ist die Translokation t(7;12) bisher nicht in das Klassifikationsschema der WHO aufgenommen worden.

Morphologisch entsprechen die Blasten von Translokation t(7;12)-positiven Patienten zumeist einem sehr frühen beziehungsweise unreifen Differenzierungsgrad (FAB M0-M2), begleitet von der Expression des Stammzellmarkers CD34 in über 70 % der Fälle [75].

Die Prognose für Patienten, die diese Translokation tragen, ist schlecht. Nur 0-14 % überleben die ersten drei Jahre nach Diagnose ohne ein Rezidiv zu erleiden, während die kumulative Überlebensrate bei 0-28 % liegt [75-78].

Erstmalig beschrieben wurde die Translokation t(7;12)(q36;p13) im Jahr 2000 [79]. Beteiligt an der Translokation ist das Chromosom 7 in Bande q36 und das Chromosom 12 in Bande p13. Beide Regionen sind in etwa gleich groß und befinden sich nahe den Telomeren des jeweiligen Chromosoms, ein Bereich in dem sich die Chromosomen anhand ihres Bandenmusters nicht mehr deutlich voneinander unterscheiden lassen, weswegen die Translokation über konventionelle Chromosomenbänderungsanalyse nur schwer zu erkennen ist [75].

Zusammen mit der Translokation treten spezifische Aneuploidien, wie beispielsweise ein zusätzliches Chromosom 19 und/oder Chromosom 8, auf, und können in der Diagnostik als Hinweis auf das Vorhandensein dieser Translokation dienen [73, 75, 79]. Eine gezielte Detektion ist mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) möglich [78, 80]. Aufgrund der Schwierigkeiten in der Detektion geht man davon aus, dass diese Translokation häufiger auftritt, als bisher angenommen [80].

Der Bruchpunkt auf Chromosom 12 liegt konsistent in der 5´-Region des Gens *ETS Variant 6* (*ETV6)*, während sich der Bruchpunkt auf Chromosom 7 heterogen darstellt [73, 76, 81]. In 50 % der Patienten wurde der Bruchpunkt auf Chromosom 7 in dem Gen *Motor Neuron And*

Pancreas Homeobox 1 (*MNX1)*, auch *HLXB9* genannt, lokalisiert, während er sich in der anderen Hälfte variabel proximal zu *HLXB9* befindet. Im ersten Fall, kommt es zur Fusion beider Gene, während im zweiten Fall das *HLXB9*-Gen ohne Disruption auf das Chromosom 12 transloziert wird.

Bei der Bildung des Fusionsgens *HLXB9-ETV6* kommt es zur Fusion von Exon 1 des *HLXB9* Gens mit Exon 2 oder 3 des *ETV6* Gens [82]. Die Fusion mit Exon 2 erfolgt *in frame*, so dass das genetische Leseraster beider Gene erhalten bleibt, während die Fusion mit dem Exon 3 in einem *out-of frame* Transkript resultiert, bei dem das Leseraster verschoben wird [82].

Da das Fusionsgen nur in 50 % der Fälle detektiert wird und auf Proteinebene nicht nachgewiesen wurde, geht man davon aus, dass ein anderer Mechanismus das onkogene Potential in dieser AML Entität birgt [75].

Ein Funktionsverlust von ETV6, wie er zu 70 % bei Translokation t(12;21)-*ETV6/AML1* positiver ALL in Folge von Deletion des nicht-translozierten *ETV6* Allels auftritt und zur Leukämogenese beiträgt, konnte nicht beobachtet werden [83].

Andere Translokationen sind bekannt, in die *ETV6* involviert ist, aber kein funktionales Fusionsprotein entsteht, sondern es zu einer ektopen Expression von Genen kommt, die in nächster Nähe zum Bruchpunkt liegen. Dies wurde beschrieben für die Translokationen t(4;12)(q11-q12;p13) und t(5;12)(q31;p13), bei denen es zu einer aberranten Expression des Homeobox Gens *GSH2* beziehungsweise des Gens *IL3* kommt, welche als Mechanismus für die Entstehung dieser Leukämien postuliert wurde [84].

Die Untersuchung der Expression von *ETV6* und *HLXB9*, sowie weiterer Gene, die den 7q36-Bruchpunkt flankieren (*NOM1, LMBR1, RNF32, SHH*), zeigte ausschließlich für *HLXB9* eine veränderte Expression in Translokation t(7;12)-positiven Patienten verglichen zu Translokation t(7;12)-negativen AML-Patienten, ALL-Patienten und Gesund-Kontrolle [75]. Eine Expression von *HLXB9* konnte nur in den Translokation t(7;12)-positiven Patienten, nicht aber in den Vergleichsproben nachgewiesen werden. Diese ektope *HLXB9*-Expression wurde sowohl in Translokation t(7;12)- positiven Patienten, bei denen der Bruchpunkt im *HLXB9*-Gen lag, als auch bei Patienten, in welchen der Bruchpunkt proximal von HLXB9 lokalisiert war, detektiert. Basierend darauf scheint die *HLXB9* Expression von dem Wildtyp-Allel auszugehen, welches nicht in die Translokation involviert ist [75].

Die ektope Expression von *HLXB9* konnte bisher in allen untersuchten Translokation t(7;12)-positiven Patienten nachgewiesen werden und stellt zur Zeit das einzige Charakteristikum dar, welches allen Translokation t(7;12)-positiven Patienten gemein ist. Basierend darauf wird

angenommen, dass die ektope Expression von *HLXB9* und nicht die Entstehung eines Fusionsgens der Leukämie-initiierende Faktor in dieser Leukämieentität ist [85].

Ein solcher Leukämie-initiierender Mechanismus konnte funktional bereits für die Translokation t(12;13)(p13;q12)-positive AML gezeigt werden, in welcher *ETV6* mit dem Homöoboxgen *CDX2* fusioniert, die Gensequenz von *CDX2* jedoch vollkommen erhalten bleibt und CDX2 in Folge der Translokation ektop in diesen Zellen exprimiert wird [86]. So induzierte nur die Transplantation von mit CDX2 transduzierten HSPZ und nicht die Transplantation von Zellen, die das Fusionsgen trugen, eine Leukämie in den Empfängertieren [86].

1.5 *HLXB9* kodiert für das Homöoprotein HB9

1.5.1 Gen- und Proteinstruktur

Das Gen *HLXB9* gehört zu der Familie der Homöobox-Gene. Charakteristisch für diese Genfamilie ist die Homöobox, eine 180 bp lange Sequenz, die für die Homöo-Domäne kodiert [87]. Die Homöo-Domäne besteht aus 60 Aminosäuren und fungiert als DNA-Bindedomäne. Homöobox-Gene sind evolutionär hoch-konservierte übergeordnete Kontrollgene, die als Transkriptionsfaktoren die Differenzierung von Zellen und Geweben während der Embryonalentwicklung steuern [88].

Die Gensequenz von *HLXB9* wurde zuerst im Menschen [89, 90] und darauf folgend auch in anderen Vertebraten beschrieben [91-93]. Das *HLXB9* Gen umfasst 5,8 kb und setzt sich aus 3 Exonen zusammen, von denen Exon 2 und 3 anteilig die Homöodomäne kodieren (Abb. 3A). Die Promotorregion ist sehr GC-reich und beinhaltet eine CpG-Insel, die sich über 800 bp 5´ vom Transkriptionsstart erstreckt [90].

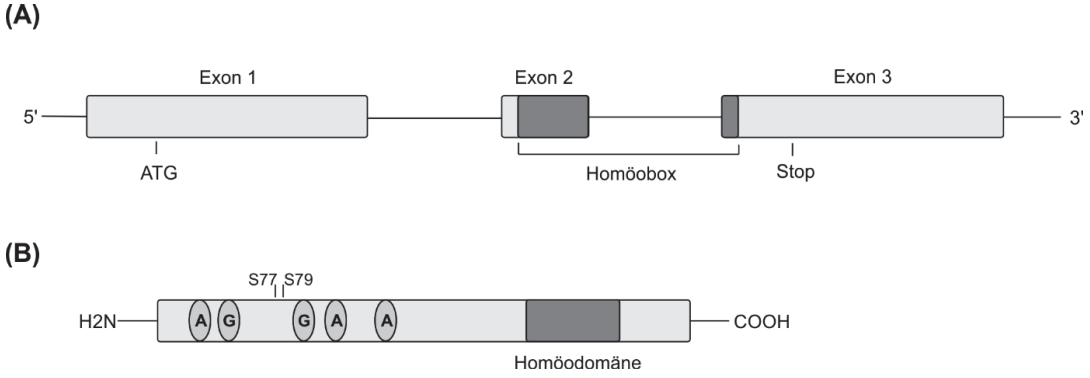

Abb. 3: Schematische Darstellung der HB9 Gen- und Proteinstruktur. (A) Schematische Darstellung der HLXB9-Genstruktur. Angegeben sind Start/ Stopp-Codon und die Homöobox. **(B)** Schematische Darstellung der HB9 Proteinstruktur. Angegeben sind Monoaminosäure-Abfolgen von Glycin und Alanin, spezifische Phosphorylierungsstellen Ser77/Ser79, sowie die Homöodomäne.

HLXB9 kodiert für das Protein HB9, welches aus 401 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 41 kDa aufweist [90]. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung zeigt eine Anreicherung von Alanin (17 %), Glycin (14 %) und Prolin (10 %), die in Monoaminosäure-Abfolgen auftreten (Abb. 3B), welche als *Linker* zwischen Proteindomänen angesehen werden [94]. Der Bereich zwischen Aminosäure 354 und 367 zeichnet sich durch eine Akkumulation saurer Aminosäuren aus, welche als „*acidic stretches*" bezeichnet werden und an der nukleären Lokalisation von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind [95]. Serine an Position 77 und 79 dienen als Phosphorylierungsstelle für Serin-Kinasen, wie beispielsweise Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK3β), wodurch es zu einer Stabilisierung des Proteins kommt [96].

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem (NP_005506.3) und murinem (NP_064328.2) HB9 zeigt eine Übereinstimmung von 88 % über die Gesamtlänge des Proteins, sowie eine vollständige Homologie in der Homöodomäne und bestätigt so die hohe Konservierung von HB9 als Homoöprotein innerhalb der Mammalia (Abb. 4).

```
human      MEKSKNFRIDALLAVDPPRAASAQSAPLALVTSLAAAASGTGGGG-GGGGASGGTSGSCS     59
mouse      MEKSKNFRIDALLAVDPPRAASTQSAPLALVTSLATTVSGPGRGGSGGGGGTSSGASRSCS     60
           **********************:************::.** * ** ****:*.*:* ***

human      PASSEPPAAPADRLRAESPSPPRLLAAHCALLPKPGFLGAGGGGGGTGGGHGGPHHHAHP     119
mouse      PASSEATAAPGDRLRAESPSPPRLLAAHCALLPKPGFLGAGGGGG-AAGGPGTPHHHAHP     119
           *****  ***.********************************** :.** * *******

human      GAAAAAAAAAAAAAAGGLALGLHPGGAQGGAGLPAQAALYGHPVYGYSAAAAAAALAGQH     179
mouse      GAAAAAAAAAAAAAAGGLALGLHPGGAQGGAGLPAQAALYGHPVYSYSAAAAAAALAGQH     179
           ********************************************.**************

human      PALSYSYPQVQGAHPAHPADPIKLGAGTFQLDQWLRASTAGMILPKMPDFNSQAQSNLLG     239
mouse      PALSYSYPQVQGAHPAHPADPIKLGASTFQLDQWLRASTAGMILPKMPDFSSQAQSNLLG     239
           **************************.**********************.*********

human      KCRRPRTAFTSQQLLELEHQFKLNKYLSRPKRFEVATSLMLTETQVKIWFQNRRMKWKRS     299
mouse      KCRRPRTAFTSQQLLELEHQFKLNKYLSRPKRFEVATSLMLTETQVKIWFQNRRMKWKRS     299
           ************************************************************

human      KKAKEQAAQEAEKQKGGGGGAGKGGAEEPGAEELLGPPAPGDKGSGRRLRDLRDSDPEED     359
mouse      KKAKEQAAQEAEKQKGGGGGTGKGGSEEKTEEELMGPPVSGDKASGRRLRDLRDSDPDED     359
           *********************:****:**   ***:***. ***.*************:**

human      EDEDDEDHFPYSNGASVHAASSDCSSEDDSPPPR---PSHQPAPQ      401
mouse      EDDEEEDNFPYSNGAGAHAASSDCSSEDDSPPPRLGGPGHQPLPQ      404
           **:::**:*******..*****************   *.*** **
```

Abb. 4: Vergleich der humanen und murinen Proteinsequenz von HB9. Die humane (NP_005506.3) und murine (NP_064328.2) HB9-Proteinsequenz wurde mittels ClustalW auf Sequenzhomologien analysiert. Die Analyse ergab eine Sequenzhomologie von 88 %. Die Homöodomäne (rot) zeigt eine vollständige Homologie.

1.5.2 Physiologische Expression und Funktion von HB9

Als Homöoprotein ist HB9 funktional an der Pankreasentwicklung sowie der neuronalen Differenzierung während der Embryogenese beteiligt.

Beginnend von Tag 8 der murinen Embryonalentwicklung wird HB9 im Notochord, sowie dem gesamten dorsalen Endoderm und dem ventralen prä-pankreatischen Endoderm exprimiert [93, 97]. Im weiteren Verlauf beschränkt sich die Expression von HB9 auf die dorsale Pankreasanlage und findet sich an Tag 17.5 der Embryogenese nur noch in den Insulin-produzierenden β-Zellen der pankreatischen Inseln wieder. Entsprechend der Expression in Wildtyp (WT) Mäusen, zeigen HB9-*knockout* (KO) Mäuse keine Ausbildung der dorsalen Pankreasanlage, sowie eine Reduktion an β-Zellen [93, 97]. Vorhandene β-Zellen sind nicht terminal ausdifferenziert. Studien im Zebrafischmodel belegen, dass HB9 essentiell für die β – Zell Entwicklung ist, indem es die α-Zell Differenzierung unterdrückt und so die terminale β-Zell Differenzierung fördert [98].

Nicht nur die Expression von HB9, sondern auch deren strikte zeitliche Kontrolle ist für eine funktionale Entwicklung des Pankreas maßgeblich. Studien im *Ipf1/Hlxb9* transgenen Mausmodell zeigten, dass eine dereguliert anhaltende HB9-Expression zu einer Dedifferenzierung des Pankreas führte [99].

In der neuronalen Entwicklung ist HB9 essentiell für die Ausbildung von Motoneuronen. Ebenso wie bei der β-Zell Differenzierung im Pankreas, fördert HB9 die motoneuronale Differenzierung, indem es die Expression Interneuron-spezifischer Gene reprimiert [100, 101]. In HB9-KO Mäusen kommt es zur Entstehung von Hybridzellen, die sowohl Charakteristika von Moto- als auch von Interneuronen aufweisen. Infolgedessen konnten Defekte in der axonalen Wegfindung beobachtet werden [100].

Neben der Expression von HB9 während der Embryonalentwicklung konnte über RNA *in situ* Hybridisierung zudem eine Expression in verschiedenen maturen Geweben, wie Dünndarm, Kolon und Testis nachgewiesen werden [90].

Eine Funktion von HB9 in hämatopoetischen Zellen ist nicht bekannt, auf Transkriptebene konnte jedoch eine Expression von HB9 in B-Lymphozyten detektiert werden [90, 102]. Eine weitere Studie beschrieb zudem die Expression von HB9 in $CD34^+$ Knochenmarkszellen [103], konnte jedoch durch andere Studien nicht belegt werden [75, 104, 105].

1.5.3 Deregulierte HB9-Expression in Erkrankungen

Mutationen im *HLXB9* Gen, sowie eine deregulierte Expression werden mit verschiedenen Erkrankungen und Neoplasien in Verbindung gebracht.

Seit längerem ist bekannt, dass heterozygote *loss of function* Mutationen im *HLXB9* Gen zum Currarino Syndrom führen, einer angeborenen Fehlbildung mit anorektaler, sakraler Malformation und präsakraler Raumforderung, welche autosomal dominant vererbt wird [106, 107]. Neuere Studien zeigen, dass homozygote Mutationen im *HLXB9* Gen, entsprechend seiner essentiellen Bedeutung für die Differenzierung und Erhaltung Insulin-produzierender β-Zellen, ursächlich für permanente neonatale Diabetes sind [108, 109].

Im Insulinom, einem Insulin-produzierenden β-Zell Tumor, wird HB9 durch Phosphorylierung stabilisiert und akkumuliert infolgedessen [96]. In der murinen Insulinom Zelllinie MIN6 konnte mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass phosphoryliertes HB9 mit Nono, einem DNA- und RNA-bindenden Protein, das in verschiedene nukleäre Prozesse involviert ist, interagiert [110]. Zudem zeigte die Studie, dass phospho-HB9 über direkte Promotorinteraktion zu einer Repression von Cblb, einem Inhibitor der onkogenen Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Met, führte [110].

Des Weiteren wurde eine deregulierte Expression von HB9 in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen. Microarray-Analysen undifferenzierter hepatozellulärer Karzinome identifizierten HB9 als das am stärksten differentiell exprimierte Gen im Vergleich zum Normalgewebe [111]. Eine gesteigerte HB9-Expression konnte sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, wurde jedoch zytoplasmatisch lokalisiert, wodurch ein funktionaler Einfluss von HB9 in diesem Zusammenhang als fraglich erscheint.

Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse der Expression von Homöoboxgenen bei Kolonkarzinomen eine Reduktion von HB9 verglichen zu dem entsprechenden Normalgewebe in der immunhistochemischen Färbung [112].

In Zusammenhang mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wird eine ektope Expression von HB9 wie bereits erwähnt mit Translokation t(7;12)-positiver AML assoziiert.

Des Weiteren wurde eine ektope Expression von HB9 in der AML-Zelllinie GDM1 detektiert [105]. Diese weist die Translokation t(6;7)(q23;q36) auf, in Folge derer HB9 anderen regulatorischen Elementen unterworfen wird.

Die präferentielle Expression von HB9 in AML verglichen zu ALL wird unterstützt durch epigenetische Studien, welche zeigen, dass der *HLXB9* Promotor deutlich häufiger in ALL als in AML-Proben hypermethyliert vorliegt und so der Lokus epigenetisch reprimiert wird [113].

1.6 Bedeutung von HB9 in der Translokation t(7;12)-vermittelten Leukämogenese

Erste Studien zur Untersuchung der Leukämogenese Translokation t(7;12)-positiver AML, sowie der Bedeutung von HB9 in diesem Zusammenhang, wurden in unserer Arbeitsgruppe angefertigt. Expressionsanalysen zeigten, dass sich die Translokation t(7;12)-positive AML in ihrem Transkriptionsprofil deutlich von der *MLL*-positiven AML unterscheidet, welche den Großteil der Säuglings-AMLs darstellt [114]. Während dem Transformationsprozess *MLL*-positiver AML die gesteigerte Expression bestimmter HOX-Gene zugrunde liegt, welche pro-proliferativ wirken, waren diese im Vergleich in Translokation t(7;12)-positiven AML Proben herunterreguliert. Stattdessen zeigte sich im Vergleich zur *MLL*-positiven AML eine gesteigerte Expression von Genen, die der Zell-Zell-Interaktion und Zelladhäsion dienen, wie *EDIL3, CNTNAP5, ANGPT1, DSG2, ITGA9, ITGAV, KDR* und *SIGLEC6* [114].

In *Replating Assays* zeigten *HLXB9* und *HLXB9-ETV6* transduzierte HSZ kein erhöhtes Selbsterneuerungspotential, wie man es bei *MLL-ENL* transduzierten Zellen beobachten konnte. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Expression von *HLXB9* oder *HLXB9-ETV6* alleine nicht zur Transformation der Zelle führen kann. Stattdessen wurde die These aufgestellt, dass *HLXB9* über Induktion von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt die Interaktion von HSZ und Stroma moduliert und so eine Leukämieentstehung fördert, oder es durch Modulation der Knochenmarksnische zu einem protektiven Effekt zugunsten der leukämischen Blasten kommt [114].

In weiteren Studien konnten wir über Untersuchung von Promotorbindung und Expression *Prostaglandin E Receptor 2* (*PTGER2)* als direktes Zielgen von HB9 im HL-60 Zellmodell identifizieren [104]. *PTGER2* kodiert für den Prostaglandin E Rezeptor 2 (EP2), einen von vier PGE2 Rezeptoren, die intrazellulär über verschiedene Signaltransduktionskaskaden agieren [115]. Die Bindung von PGE2 an EP2 führt zu einer gesteigerten Produktion von cAMP, gefolgt von Induktion cAMP/PKA-abhängiger Genexpression [116]. Die HB9-abhängig verringerte Expression von *PTGER2* in den HL-60 Zellen wurde funktionell über eine verringerte Freisetzung von cAMP infolge der Ligandenbindung belegt. Zudem konnte die verringerte Expression von *PTGER2* in Translokation t(7;12)-positiven Patienten validiert werden [104]. Die bisher untersuchten Zellsysteme bestanden ausschließlich aus transformierten Zellen, weswegen zu der Bedeutung von HB9 im Rahmen der Leukämieentstehung in primären hämatopoetischen Zellen keine Aussage gemacht werden kann.

2 Ziele der Arbeit

Die Translokation t(7;12)-positive AML ist durch eine ektope Expression des Transkriptionsfaktors HB9 gekennzeichnet. Welche Bedeutung HB9 in der Leukämogenese Translokation t(7;12)-positiver AML einnimmt ist bisher nicht geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung einer Expression von HB9 in primären hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen und deren Einfluss auf die Entstehung einer myeloiden Leukämie zu definieren. Hierfür wurden die folgenden Fragestellungen definiert und anhand der angegebenen Modelle adressiert:

1) Welchen Einfluss hat die HB9 Expression auf das Genexpressionsprofil humaner $CD34^+$ HSPZ?
   Modell: RNAseq-Analyse lentiviral mit HB9 transduzierter $CD34^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut

2) Beeinflusst HB9 als mögliches Onkogen Proliferation und Zellzyklus?
   Modell: Proliferations- und Zellzyklusanalyse in HB9 transduzierten humanen und murinen Zelllinien

3) Welchen Einfluss hat HB9 auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen *in vivo*?
   Modell: Murines Transplantationsmodell HB9 transduzierter HSPZ und Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution

4) Identifizierung neuer therapeutischer Targets zur Behandlung HB9 exprimierender Translokation $t(7;12)^+$ AML
   Modell: *Screening* von 274 Wirkstoffen im HB9 transduzierten HL-60 Zellmodell

3 Methoden

3.1 Material

Alle verwendeten Materialien, Geräte und Puffer sind im Anhang aufgelistet (vgl. 7.1).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Um die als Kompetenz bezeichnete Aufnahmefähigkeit der Bakterien für zirkuläre DNA zu erhöhen wurde die Rubidiumchlorid-Methode angewandt [117]. Eine Über-Nacht Kultur von *Escherichia coli* (*E.coli*) wurde mit LB-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,6 bei 37°C geschüttelt. Danach wurde die Kultur pelletiert (5000 *g*, 4°C, 20 min.), in 1/3 des Ausgangsvolumens RF1-Puffer resuspendiert und für 90 min. bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet in 1/12,5 des Ausgangsvolumens RF2-Puffer resuspendiert. Die in den Puffern enthaltenen divalenten Kationen sorgen dafür, dass die Zellmembran porös wird. Die Bakteriensuspension wurde zügig in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E. coli* und Bakterienkultur

Zur Transformation von DNA in *E.coli* wurde die Hitzeschock-Methode angewandt [118], wobei die Bakterien einer Kälte-Wärme-Behandlung unterzogen werden. Chemisch kompetente *E. coli* (vgl. 3.2.1) wurden auf Eis aufgetaut, 10 ng - 100 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes hinzugefügt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 s und eine 2 min. Inkubation auf Eis. Darauf wurden die Zellen in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden Verdünnungsausstriche des Transformationsansatzes auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Spectinomycin) angefertigt und über Nacht bei 37°C inkubiert.
Von den Platten wurden Einzelkolonien isoliert und in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsdruck inokuliert. Diese Start-Kultur wurde über Tag geschüttelt (37°C und 250 rpm) und für das Animpfen einer größeren Übernachtkultur verwendet.

3.2.3 Plasmidisolation

Für die Plasmidisolation aus kleinen Volumina Bakterienkultur (2 ml) wurde das "Fast Plasmid Mini Kit" (5´Prime) nach Herstellerangabe verwendet. Hierbei werden die Zellen durch einen Mix aus Enzymen und Detergentien lysiert, störende Proteine denaturiert und RNA degradiert, gefolgt von einer Säulen-basierten DNA-Aufreinigung. Größere Plasmidmengen wurden mit dem "Nucleobond Xtra Maxi Kit" (Macherey Nagel) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Das Kit basiert auf einer alkalische Lyse der Zellen, gefolgt von einer Säulen-basierten DNA-Aufreinigung. Für die Aufreinigung endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde das "Endotoxin Free Plasmid Maxi Kit" (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4 Restriktionsverdau

Zum Klonieren von DNA-Sequenzen wurden die PCR-Produkte oder Plasmide mit Restriktionsendonukleasen (NEB) verdaut. Für den Restriktionsverdau wurden 1 µg DNA mit 10 Units der jeweiligen Enzyme, dem passenden Puffer und BSA in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Geschnittene PCR-Produkte wurden im Anschluss über das "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN) aufgereinigt, geschnittene Plasmide wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (siehe 3.2.5).

3.2.5 Agarose-Gelektrophorese und Gelelution von DNA-Fragmenten

Zur Größenbestimmung oder zur Isolation von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau wurden die Proben über Gelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Je nach Länge der DNA-Fragmente wurden 0,8 - 2,5 %ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer (BioRad) unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem entsprechenden DNA Größenstandard (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific) elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Detektion wurde ein UV-Transilluminator (INTAS) verwendet, da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter UV_{365nm}-Licht ausgeschnitten und die DNA mithilfe des "QIAquick Gel Extraction Kits" (QIAGEN) aufgereinigt.

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgt durch die virale T4 DNA Ligase, welche die Bildung von Phosphodiester-Brücken zwischen benachbarten 3´-Hydroxyl- und 5´-Phosphatgruppen katalysiert. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, ausgehend von 50 ng Vektor-DNA. Die Insertmenge wurde wie folgt berechnet:

$$x\ ng\ Insert = \frac{(\text{y Basenpaare Insert}) \text{ x } (50\ \text{ng Vektor} - \text{DNA}) \text{ x } 3}{\text{Anzahl Basenpaare Vektor} - \text{DNA}}$$

3.2.7 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA Sequenzen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt. Neben einer Standard-Taq-Polymerase wurde für Klonierungen die Phusion-Polymerase verwendet, welche zusätzlich über eine 3´ > 5´-Exonukleaseaktivität verfügt, wodurch die Fehlerrate bei der Amplifikation minimiert wird. Nachfolgend sind Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Amplifikationsprotokoll unter Verwendung der Taq- (Tab.3,4), sowie der Phusion-Polymerase aufgeführt **(**Tab.5,6).

Tab. 3: Pipettierschema einer PCR mit Taq-Polymerase.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTP	je 10 nmol	200 µM
Forward-Primer	25 pmol	0,5 µM
Reverse-Primer	25 pmol	0,5 µM
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 Units
DNA	100 ng	
deion.H_2O	*ad* 50 µl	

Tab. 4: Amplifikationsprotokoll einer PCR mit Taq-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion	
1	94°C	3 min.	Initiale Denaturierung	
2	94°C	30 s	Denaturierung	30-35 Zyklen
3	55-62°C	30 s	Anlagerung	
4	72°C	1 min.	Verlängerung	
5	72°C	10 min.	Finale Verlängerung	

Tab. 5: Pipettierschema einer PCR mit Phusion-Polymerase.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
2x PCR Mastermix	10 µl	1x
Forward-Primer	10 pmol	0,5 µM
Reverse-Primer	10 pmol	0,5 µM
DNA	100 ng	
deion.H_2O	*ad* 20 µl	

Tab. 6: Amplifikationsprotokoll einer PCR mit Phusion-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion	
1	98°C	1 min.	Initiale Denaturierung	
2	98°C	10 s	Denaturierung	30-35 Zyklen
3	55-62°C	30 s	Anlagerung	
4	72°C	30 s	Verlängerung	
5	72°C	7 min.	Finale Verlängerung	

3.2.7.1 Sybr Green und Sonden basierte quantitative Real-Time PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden quantitative Real-Time PCRs (qRT-PCR), basierend auf SYBR Green oder fluoreszenzmarkierten Sonden verwendet.

SYBR Green:

Bei der SYBR Green basierten quantitativen Real-Time PCR interkaliert der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I in die doppelsträngige DNA. Die im Anschluss an jeden Zyklus gemessene Fluoreszenz korreliert mit der entstanden Produktmenge und nimmt mit jedem Zyklus zu. Für die Durchführung einer SYBR Green basierten qRT-PCR wurde das in Tab. 7 aufgeführte Pipettierschema, sowie das in Tab. 8 aufgeführte Amplifikationsprotokoll verwendet. Im Anschluss an die Amplifikation wurde zur Spezifitätskontrolle eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die Temperatur schrittweise erhöht um das PCR-Produkt aufzuschmelzen und parallel die Fluoreszenzabnahme gemessen.

Tab. 7: Pipettierschema einer SybrGreen-basierten qRT-PCR.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
2x SYBR Green Mastermix	10 µl	1x
Forward-Primer	10 pmol	0,5 µM
Reverse-Primer	10 pmol	0,5 µM
cDNA	5 - 20 ng	
deion.H_2O	ad 20 µl	

Tab. 8: Amplifikationsprotokoll einer SybrGreen-basierten qRT-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion	
1	95°C	10 min.	Initiale Denaturierung	
2	95°C	15 s	Denaturierung	40 - 45 Zyklen
3	60°C	1 min	Anlagerung + Verlängerung	
4	95°C	10 s	Schmelzkurve	
5	65 - 95°C (0,5°C)	5 s	Schmelzkurve	

Sequenzspezifische Sonden:

Bei der Sonden-basierten qRT-PCR werden hydrolytische Sonden eingesetzt, die an eine bestimmte Sequenz des PCR-Produktes binden. Am 5‘-Ende der Sonde befindet sich ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3‘-Ende ein Quencher. Solange die Sonde ungebunden vorliegt unterdrückt der Quencher das Fluoreszenzsignal. Erst wenn die Sonde an die DNA gebunden hat und der Zweitstrang synthetisiert wird kommt es zur Trennung von Quencher und Fluorophor durch die 5′ > 3′- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zu der Menge an neu synthetisierter DNA.

In dieser Arbeit wurden neben selbst designten Primern und Sonden (siehe 3.2.7.3), kommerziell erhältliche TaqMan-Genexpressions Assays (Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktionen wurden mit dem TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Das darin enthaltene Enzym Uracil-DNA Glycosylase (UDG) degradiert spezifisch Uracil aus einzel- und doppelsträngiger DNA. Da der Mastermix statt dTTP das Analogon dUTP beinhaltet, kann die UDG dUTP-beinhaltende kontaminierende PCR-Produkte vorangegangener Amplifikationen eliminieren. Die Zusammensetzung (Tab. 9) und Amplifikation (Tab. 10) einer qRT-PCR mit TaqMan-Proben ist nachfolgend gezeigt. Da die eigens designten Primer-Proben-Paare für Multiplex-PCRs verwendet wurden, finden sich Zusammensetzung und Amplifikationsprotokoll unter Abschnitt 3.2.7.2.

Die Auswertung der qRT-PCRs erfolgte nach der $\Delta\Delta C^T$ - Methode [119]. Als Referenzgen wurde *β-Aktin* verwendet.

Tab. 9: Pipettierschema einer Sonden-basierten qRT-PCR.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl	1x
20x TaqMan Gene Expression Assay	1 µl	1x
cDNA	5 - 20 ng	
deion.H_2O	ad 20 µl	

Tab. 10: Amplifikationsprotokoll einer Sonden-basierten qRT-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion	
1	50°C	2 min.	UDG Inkubation	
2	95°C	10 min	Initiale Denaturierung	
3	95°C	15 s	Denaturierung	40 - 45 Zyklen
4	60°C	1 min.	Anlagerung + Verlängerung	

3.2.7.2 Sonden-basierte Multiplex-qRT-PCR

Bei einer Multiplex - PCR werden zwei oder mehr PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß kombiniert. Um die PCR-Reaktionen in einer qRT-PCR getrennt voneinander detektieren zu können, müssen die jeweiligen Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sein. In dieser Arbeit wurden in einer Multiplex-PCR zwei PCR-Reaktionen kombiniert und als Markierung für die Sonden entweder Fluorescein (FAM) oder 6-Hexachlorofluorescein (HEX) gewählt, kombiniert mit dem Black-Hole Quencher 1 (BHQ1). Für PCRs, die gemultiplext werden sollten, wurde die optimale Primerkonzentration zunächst getrennt und dann abhängig voneinander bestimmt. Nachfolgend ist die Zusammensetzung einer Multiplex-PCR aufgeführt (Tab. 11). Das Amplifikations-protokoll entsprach dem für Sonden-basierte qRT-PCR (vgl. 3.2.7.1).

Tab. 11: Pipettierschema einer Sonden-basierten Multiplex qRT-PCR.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl	1x
Forward-Primer Zielgen	10 pmol	0,5 µM
Reverse-Primer Zielgen	10 pmol	0,5 µM
Forward-Primer Referenzgen	1,25 pmol	0,0625 µM
Reverse-Primer Referenzgen	1,25 pmol	0,0625 µM
Sonde Zielgen	5 pmol	0,25 µM
Sonde Referenzgen	5 pmol	0,25 µM
cDNA	5 - 20 ng	
deion.H_2O	*ad* 20 µl	

3.2.7.3 Primer/Sonden-Design und Überprüfung der Produktspezifität

Für das Design der Primer und Sonden wurden die Programme "Primer3" und "Primer-BLAST" verwendet. Primerpaare zur Bestimmung der Genexpression wurden Exon-Exon übergreifend designt, um eine Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Alle

Primerpaare wurden über "Primer-BLAST" mit dem Referenz-Genom und dem Referenz-Transkriptom abgeglichen, um die Amplifikation unspezifischer PCR - Produkte zu vermeiden. Um die Spezifität jedes Primerpaares zu belegen, wurde das resultierende PCR-Produkt zur Größenermittlung elektrophoretisch aufgetrennt und nach Sanger sequenziert.

3.2.8 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Sequenzüberprüfung von PCR-Produkten oder Klonierungen wurden die DNA-Sequenzen über die Kettenabbruch-Methode nach Sanger sequenziert [120]. Hierfür wurde das "Big Dye Terminator Sequencing Kit v3.1" (Applied Biosystems) verwendet. Vor der Sequenzierung wurden die DNA-Fragmente über das "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN) aufgereinigt. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 25 ng und für die von Plasmiden 500 ng eingesetzt. Für GC-reiche Sequenzen wurde der Sequenzierreaktion 5 % DMSO hinzugefügt und das Plasmid vorher enzymatisch linearisiert, um den Einfluss von Sekundärstrukturen zu minimieren. Nachfolgend sind Zusammensetzung und Protokoll einer Sequenzierungsreaktion aufgeführt (Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14).

Tab. 12: Pipettierschema einer Sequenzierreaktion.

Reagenz	Menge
Big Dye Terminator Sequencing Mix	4 -8 µl
Primer	5 pmol
DNA	25 - 500 ng
deion.H_2O	ad 20 µl

Tab. 13: Temperaturprotokoll einer Sequenzierreaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	96°C	1 min.	
2	96°C	10 s	25 Zyklen
3	50°C	5 s	
4	60°C	4 min.	

Tab. 14: Temperaturprotokoll einer Sequenzierreaktion bei hohem GC-Gehalt.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	95°C	5 min.	
2	95°C	30 s	30 Zyklen
3	55°C	30 s	
4	60°C	4 min.	

Im Anschluss wurden die Sequenzierreaktionen mithilfe des "DyeEx 2.0 Spin Kit" (QIAGEN) aufgereinigt, mit gleichem Volumen Formamid versetzt und auf einem ABI 3130 Kapillar-Sequenziergerät (Applied Biosystems) sequenziert.

3.2.9 Isolierung von RNA

Für die Isolation von RNA aus dem Blut von Mäusen wurde das Blut direkt nach der Abnahme in "*RNAprotect Animal Blood tubes*" (QIAGEN) überführt, in denen sich eine Lösung befindet, die die Erythrozyten lysiert und die RNA stabilisiert. Nach 2-3 h Inkubation wurde die RNA mithilfe des "*RNeasy Protect Animal Blood Kit*" (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

Für die Isolation von RNA aus Zellpellets wurde je nach Zellmenge entweder das "RNeasy Mini Kit" oder das "RNeasy Micro Kit" (QIAGEN) laut Herstellerprotokoll verwendet. Bei jeder RNA-Isolation wurde der optionale DNase-Verdau durchgeführt, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA zu vermeiden. Zur Aufreinigung von DNA und RNA aus einer Probe wurde das "*AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit*" oder das "*AllPrep DNA/RNA Micro Kit*" (QIAGEN) verwendet. Im Anschluss an die Isolation wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.2.10 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von DNA aus dem Blut von Mäusen wurde das "*DNeasy Blood and Tissue Kit*" (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Als Mindestmenge wurden 4 µl Blut eingesetzt.

Um DNA neben RNA aus Zellpellets zu isolieren wurde wie unter 3.2.9 beschrieben das "*AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit*" oder das "*AllPrep DNA/RNA Micro Kit*" (QIAGEN) verwendet. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.2.11 Synthese von copyDNA

Für die Synthese von copyDNA (cDNA) aus RNA wurde das "*QuantiTect Reverse Transcription Kit*" (QIAGEN) den Herstellerangaben nach verwendet. Es wurden zusätzlich -RT Kontrollreaktionen durchgeführt, indem dem cDNA-Syntheseansatz keine Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde. Diese dienten dem Nachweis, dass bei der anschließenden Expressionsanalyse cDNA und nicht genomische DNA amplifiziert wurde.

3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde spektralphotometrisch über ihre Absorption bei 260 nm mittels NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

3.2.13 Genexpressionsanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung (RNAseq)

3.2.13.1 RNAseq - Libraryherstellung

Die Durchführung der Hochdurchsatzsequenzierung mittels RNAseq erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Höll („Posttranskriptionelle Genregulation in pädiatrischen Tumoren“, Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie, Düsseldorf).
Zur Genexpressionsanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung wurden *Libraries* unter Verwendung des “TruSeq RNA Sample Prep Kit v2” (Illumina) nach Herstellerangaben generiert. Es wurden 100 ng RNA als Input verwendet.
Die verwendete RNA wurde zuvor mittels BioAnalyzer 2100 (Agilent) auf Qualität, sowie Konzentration überprüft. Es wurde nur RNA verwendet, die einen *RNA Integrity Number* (RIN)-Score von über 9,5 aufwies.
Zur Herstellung einer *Library* wurde zunächst die mRNA über magnetische Oligo-dT-Beads angereichert und fragmentiert. Nach erfolgter cDNA-Synthese und *End Repair* wurden die einzelnen Proben mit Adaptern ligiert, die spezifische Sequenzmotive (Barcode) aufweisen und somit das Kombinieren mehrerer Proben in einer Sequenzierung ermöglichen. Es folgte eine Amplifikation der *Library* mittels PCR. Die Qualität der hergestellten Libraries wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mittels Agilent DNA 1000-Chip überprüft.
Die so hergestellten sechs *Libraries* (GFP.1-3 und HB9.1-3) wurden äquimolar gemischt und auf eine Endkonzentration von 2 nM eingestellt. Dies wurde erneut mittels High Sensitivity DNA Chip auf dem Bioanalyzer 2100 überprüft. Zur Denaturierung wurde 10 µl des Pools mit 10 µl 0,1 N NaOH vermischt und 5 min. bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 980 µl eiskalter Hybridisierungs (HT1)-Puffer hinzugefügt. Danach wurde die Probe mittels HT1-Puffer auf eine Endkonzentration von 7,5 pM verdünnt. 120 µl davon wurden zusammen mit der benötigten Chemie auf den cBot geladen und im Anschluss unter Verwendung des Programms “S.R.Amp-Lin/Block/Hyb.V8” auf die Flusszelle hybridisiert.
Die Hochdurchsatzsequenzierung erfolgte über einen Illumina Hiseq2500 in 101 Zyklen, gefolgt von 7 Zyklen zum Lesen der Barcodes.
Nach erfolgtem Lauf wurden die Rohdaten mittels CASAVA 1.6 Software (Illumina) demultiplexed und fastq-Files generiert.

3.2.13.2 Bioinformatische Auswertung der RNAseq-Daten

Die bioinformatische Auswertung wurde freundlicherweise von Hr. Daniel Picard (AG Remke, DKTK Nachwuchsgruppe „Pädiatrische Neuroonkogenomik“; Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Düsseldorf) durchgeführt.
Hierfür wurden die Fastq-Files in die Software „Partek Flow“ importiert. Über Qualitätsanalyse, sowie –kontrolle wurde die Qualität der Reads ermittelt. Infolgedessen wurden aufgrund von geringer Qualität jeweils 13 Basen am 5´-Ende und 1 Base am 3´-Ende entfernt. Die so gekürzten Reads wurden über das Programm „STAR v2.4.1d” mit dem Genom (hg38) abgeglichen. Nicht-identifizierte Reads wurden mit dem Programm “Bowtie 2 v2.2.5” reanalysiert. Alle identifizierten Reads wurden mittels “Partek Expectation-Maximization (E/M) Algorithmus” anhand der Datenbank Ensembl 82v2 quantifiziert.
Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde die “Gene Set Analysis (GSA)” in Partek Flow durchgeführt. Für alle Analysen in Partek Flow wurden die Standardeinstellungen verwendet.

3.2.14 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden $5*10^6$ Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Zelllyse wurde das Pellet in 500 µl *Radioimmunprecipiation* (RIPA)-Puffer [121] resuspendiert, dem zuvor frisch Protease- (Complete EDTA-free, Roche), sowie Phosphatase- (PhosSTOP, Roche) Inhibitoren und DTT (1 mM) hinzugefügt wurden, und für 20 min. auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat 20 min. zentrifugiert (18.000 *g*, 4°C), um Zelltrümmer abzutrennen, und der Überstand in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss an die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford (BioRad) wurde das Lysat mit 5x Lämmli-Ladepuffer versetzt und für 5 min. bei 95°C inkubiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die so verarbeiteten Lysate bei -20°C gelagert.

3.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate wurde das diskontinuierliche denaturierende Tris-HCL/Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli [122] angewandt. Hierbei werden die Proteine in Gegenwart des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode aufgetrennt. Die Polyacrylamidgele,

bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurden in einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Die Proben wurden zusammen mit einem Proteingrößenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen und bei 20-25 mA separiert. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels *Wet-Blot* auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0.2 NC, GE-Healthcare) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 200 mA für 1,5 - 2h. Nach dem Transfer wurde die Membran in TBS-T + 5 % BSA für 1 - 2 h bei RT inkubiert, um die Membran zur Reduktion unspezifischer Bindung mit Protein abzusättigen. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:200 - 1:1000 in TBS-T + 5 % BSA) auf einem Roller inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3x für je 10 min. mit TBS-T gewaschen und dann für 2 h bei RT mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (1:1000 - 1:5000 in TBS-T + 5 % BSA) inkubiert. Die Detektion der Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte mithilfe des "*Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent*" (GE-Healthcare) in einem LAS-3000 Lumineszenz-Detektionssystem (GE-Healthcare).

3.3 Zellkultur Techniken

3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Eukaryotische Zellen wurden in einem mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. 293T, HT1080 und NIH3T3 wurden in DMEM+GlutaMAX-Medium unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Bei ca. 70 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 0,05 % Trypsin/ EDTA Lösung enzymatisch abgelöst. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium mit FKS abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend verdünnt in neue Zellkulturflaschen überführt und frisches Medium hinzugefügt. HL-60 Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FKS, 2 mM Glutamin und 1 % P/S kultiviert und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:4 mit frischem Medium verdünnt. Für die Kultur von HL-60_Mock/HB9-Puro Zellen zur Zellzyklusanalyse wurde dasselbe Medium wie für HL-60 unter Zusatz von 0,5 µg/ml Puromycin verwendet.

3.3.2 Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung vitaler Zellen wurden $5*10^6$ Zellen pelletiert (400 *g*, 5 min., RT) und in 1,8 ml Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in Nunc-Einfrierbehältern bei -80°C eingefroren. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter ermöglichen eine optimale Einfriergeschwindigkeit von -1°C/ min. Nach 24 h wurden die Zellen zur Endlagerung in die Gasphase flüssigen Stickstoffs (-196°C) überführt. Für die Rekultivierung wurden die Zellen zügig im 37°C- Wasserbad aufgetaut, in 10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen, pelletiert und anschließend normal kultiviert.

3.3.3 Präparation von murinen Knochenmarkszellen

Murine hämatopoetische Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von 8-10 Wochen alten C57BL/6-Mäusen gewonnen. Hierfür wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanasiert und Femur sowie Tibia entnommen. Die Knochen wurden von Geweberesten gesäubert, das obere und das untere Ende des Knochens mit der Schere abgetrennt und die Knochenmarkszellen aus den Knochenmarkhöhlen mit Hilfe einer Spritze und einer 26G-Kanüle mit MACS-Puffer (Miltenyi Biotech) herausgespült. Um das Mitführen von Geweberesten und Knochensplittern zu vermeiden wurde die Zellsuspension zunächst über ein 100 µm-Zellsieb gefiltert. Zum Vereinzeln der Zellen wurde die Zellsuspension anschließend über ein 70 µm-Zellsieb gefiltert. Vor dem Filtern wurden die Zellsiebe mit Puffer befeuchtet und nach dem Filtern erneut mit Puffer gespült um einen Verlust an Zellen möglichst gering zu halten. Die Zellzahl wurde bestimmt, indem ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Türks-Lösung versetzt wurde. Durch die in der Türks-Lösung enthaltene Essigsäure werden die Erythrozyten hämolysiert und die Leukozytenkerne durch den enthaltenen Farbstoff Gentianviolett angefärbt. Die Zellzahl wurde durch Auszählung in der Neubauer-Kammer bestimmt. Im Durchschnitt konnten ca. $4*10^7$ Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia eines Tieres gewonnen werden.

3.3.4 Anreicherung und Kultivierung von murinen HSPZ

Um aus den Knochenmarkszellen frühe hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen zu isolieren wurde das „Lineage Cell Depletion Kit, mouse“ (Miltenyi Biotech) verwendet. Das Kit beinhaltet eine Mischung biotinylierter Antikörper, die gegen so genannte *Lineage* (Lin)

Antigene gerichtet sind. Hierbei handelt es sich um Oberflächenantigene (CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, Ter-119) bereits differenzierter Blutzellen. Die Antikörper binden an reife hämatopoetische Zellen, wie T- und B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten, sowie an späte Vorläuferzellen. Anschließend erfolgt eine Gegenfärbung mit magnetischen Anti-Biotin Microbeads. Über magnetische Zellseparation können diese Zellen dann von den ungefärbten frühen Vorläufer- und Stammzellen getrennt werden.

Für die Markierung wurden die Knochenmarkszellen zunächst bei 300 *g* zentrifugiert und das Pellet in 40 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Nach der Zugabe von 10 µl Biotin-Antikörper-Mix pro 10^7 Zellen wurde die Zellsuspension für 15 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin Microbeads pro 10^7 Zellen versetzt und für weitere 20 min. auf Eis inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper und Microbeads wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen. Für die magnetische Separation wurden MACS LD-Säulen (Miltenyi Biotech) verwendet, die in einen QuadroMACS-Magneten (Miltenyi Biotech) eingespannt wurden und mit je 2 ml MACS-Puffer äquilibriert wurden. Bis zu $80*10^6$ Zellen wurden in 500 µl Puffer aufgenommen und auf eine LD-Säule geladen. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 1 ml MACS-Puffer gewaschen und das Eluat aufgefangen. Während die Lin-positiven (Lin^+) reifen hämatopoetischen Zellen auf der Säule verbleiben, befinden sich die unreifen Lin-negativen (Lin^-) Vorläufer- und Stammzellen im Eluat. Die erfolgreiche Depletion differenzierter Zellen wurde überprüft, indem vor und nach der Säule ein Aliquot an Zellen entnommen wurde und durchflusszytometrisch auf die Expression von Differenzierungsmarkern untersucht wurde.

Nach der Aufreinigung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 *g* für 10 min. zentrifugiert. Die Kultur der Zellen erfolgte in StemSpan-Medium (Stemcell Technologies), versetzt mit 10 % FKS, 1 % P/S, 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3L, 100 ng/ml TPO, 25 ng/ml IL6 und 25 ng/ml IL11, in einer Konzentration von ca. 1,8 x 10^6 Zellen/ ml.

3.3.5 Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem Nabelschnurblut

Das verwendete Nabelschnurblut entstammte der José Carreras Stammzellbank (Universitätsklinikum Düsseldorf) und wurde freundlicherweise von Fr. Prof. Dr. Kögler zur Verfügung gestellt. Ein Ethikvotum lag vor.

Die Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut erfolgte über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde das Nabelschnurblut 1:2 mit PBS verdünnt. 15 ml Ficoll (GE-Healthcare) wurde in 50 ml Zentrifugierröhrchen vorgelegt und dann langsam mit 20 ml des Blut-PBS-Gemisches überschichtet. Es folgte eine 35 min. Zentrifugation bei 400 *g* ohne Bremse. Durch die Zentrifugation lagern sich die verschiedenen Blutzellen auf verschiedenen Ebenen des Dichtegradienten an (Abb. 5). Die Erythrozyten aggregieren durch das Ficoll und befinden sich nach der Zentrifugation als Sediment auf dem Boden des Röhrchens. Direkt über den Erythrozyten finden sich die Granulozyten, welche ebenfalls durch das Ficoll-Medium migrieren konnten. Aufgrund ihrer geringen Dichte erscheinen die mononukleären Zellen hingegen als Interphase zwischen den Granulozyten und dem Blutplasma. Diese wurden unter kreisförmigen Bewegungen mit einer 5 ml-Pipette entnommen. Um Thrombozyten, sowie Plasma und Ficoll zu entfernen wurden die mononukleären Zellen 1:3 mit PBS verdünnt und bei 200 *g* für 10 min. zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde anschließend noch einmal wiederholt. Für die anschließende Anreicherung $CD34^+$ Zellen wurde das Zellpellet von initial 100 ml Nabelschnurblut mit 40 ml MACS-Puffer gewaschen, ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300 *g* für 10 min.

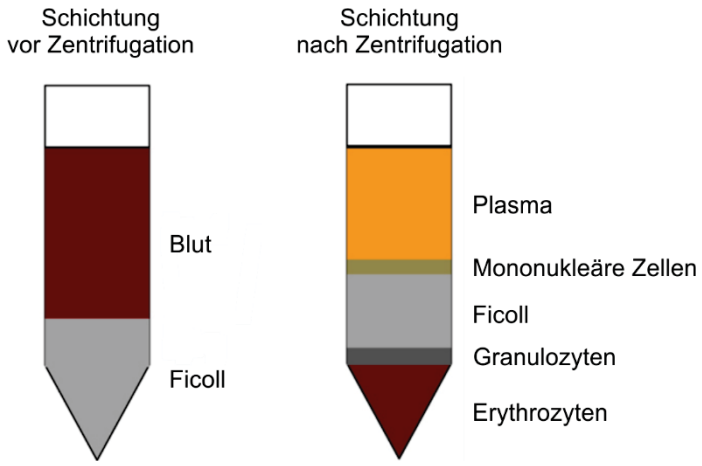

Abb. 5: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut. (Adaptiert nach [123]). Durch die Zentrifugation lagern sich die unterschiedlichen Blutzellen auf verschiedenen Ebenen des Ficoll-Dichtegradienten an. Die Erythrozyten aggregieren durch das Ficoll und befinden sich als Sediment auf dem Boden des Röhrchens. Direkt über den Erythrozyten befinden sich die Granulozyten, welche ebenfalls durch das Ficoll-Medium migrieren. Aufgrund ihrer geringen Dichte erscheinen die mononukleären Zellen als Interphase.

3.3.6 Anreicherung und Kultivierung humaner CD34$^+$ HSPZ

Um CD34$^+$ Zellen aus den mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes anzureichern, wurde das „CD34 MicoBead Kit, human“ (Miltenyi Biotech) verwendet. Wie bei der Anreicherung muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen beschrieben, basiert dieses Kit ebenfalls auf einer immunmagnetischen Zellseparation. Im Gegensatz zu dem „Lineage cell depletion Kit“ handelt es sich hierbei um eine Positiv-Selektion anstelle einer Depletion. Bis zu 1*10^8 mononukleäre Zellen, gewonnen aus Nabelschnurblut, wurden in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 100 µl FcR-Blocking-Reagenz und 100 µl Anti-CD34 Microbeads versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min. bei 4°C. Das FcR-Blocking-Reagenz dient dazu eine unspezifische Bindung des Anti-CD34-Antikörpers zu verhindern. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 5 ml MACS-Puffer pro 10^8 Zellen gewaschen (300 *g*, 10min.). Für die magnetische Separation wurden MACS LS-Säulen (Miltenyi Biotech) verwendet, die in einen QuadroMACS-Magneten eingespannt und mit je 3 ml MACS-Puffer äquilibriert wurden. Bis zu 1*10^8 Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MACS LS-Säule geladen. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Während die CD34$^+$ Zellen auf der Säule verbleiben, befinden sich alle CD34$^-$ Zellen im Eluat. Um die CD34$^+$ Zellen von der Säule zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und die Zellen mit einem mitgeliefertem Stempel von der Säule heruntergedrückt. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut auf eine MACS LS-Säule geladen, um eine höhere Reinheit an CD34$^+$ Zellen zu erlangen. Nach der Elution von der zweiten Säule wurde ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau vermischt, und in der Neubauerkammer gezählt. Vor und nach der ersten, sowie zweiten Anreicherung wurde jeweils ein Aliquot entnommen, um die Reinheit an CD34$^+$ Zellen im Eluat mittels FACS zu bestimmen. CD34$^+$ Zellen wurden in X-Vivo20-mit Gentamycin, versetzt mit 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3L, 100ng/ml TPO und 20ng/ml IL3, in einer Konzentration von 2,5*10^6 Zellen/ml kultiviert.

3.3.7 Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel

Lentiviren eignen sich hervorragend für den Gentransfer in eukaryotische Zellen, insbesondere in Primärzellen [124, 125]. Hierbei wird die genetische Information stabil in das Genom der Zielzelle integriert und an die Tochterzellen weitergegeben. Lentivirale Vektoren bieten gegenüber anderen retroviralen Vektoren den Vorteil, dass sie auch ruhende, sich nicht teilende Zellen, wie Stammzellen, infizieren können [126]. Verwendet werden replikationsdefiziente

pseudo-lentivirale Partikel, die Zielzellen einmalig infizieren können, aber nicht in der Lage sind sich zu replizieren. Weitere Sicherheitsmaßnahmen bestehen darin, dass man die genetischen Sequenzen, die für die Herstellung viraler Partikel notwendig sind, auf verschiedene Plasmide aufteilt. In dieser Arbeit wurde ein Vektorsystem der dritten Generation verwendet, bei dem die Gensequenzen für die Verpackung viraler Partikel (*gag, pol, rev*) auf zwei verschiedenen Plasmiden vorliegen, während das Gen *vsv-g*, welches das Hüllprotein kodiert, generell auf einem separaten Vektor vorliegt [127]. Zusätzlich benötigt man einen entsprechenden Expressionsvektor, auf dem die Gensequenz codiert ist, die in die Zielzelle übertragen werden soll.

Für die Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel wurden 293T-Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Polyethylenimin (PEI) [128] mit den entsprechenden lentiviralen Plasmiden transfiziert (Tab. 15) [127]. Die Angaben beziehen sich auf eine 15 cm-Schale. Das Plasmidgemisch wurde mit 3 ml DMEM, ohne Zusätze, vermischt. Parallel wurden 115 µl PEI (1 mg/ml in PBS) mit 3 ml DMEM vermischt. Anschließend wurden beide Lösungen miteinander vereint und für 20 min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 12 ml DMEM+GlutaMax, mit 15 % FKS, hinzugefügt. Von den Zellen einer 15cm-Schale (~70 % konfluent) wurde das Medium abgesaugt und das Transfektionsgemisch hinzugefügt. Nach 16 h Inkubation wurde das Transfektionsgemisch von den Zellen abgenommen und durch normales Vollmedium ersetzt. 24 h nach dem Mediumwechsel wurde infektiöser Überstand geerntet und die Zellen mit frischem Medium versehen. Der infektiöse Überstand wurde gefiltert (0,45 µm Nitrocellulose) und durch Zentrifugation (20.000 *g*, 2 h, 4°C) konzentriert. Anschließend wurden die pseudo-lentiviralen Partikel in Stemspan-Medium (10 % FKS, 1 % P/S) aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Ebenso wurde mit dem Überstand der zweiten Ernte, weitere 24 h später, verfahren.

Tab. 15: Eingesetzte Plasmidmengen zur Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel.

Vektor	Funktion	Menge/15cm-Schale
pCDH-EF1-(HB9)-T2A-GFP	Expressionsvektor	17,9 µg
M125	Helferplasmid (*gag, pol*)	17,9 µg
M126	Helferplasmid (*rev*)	7,0 µg
M127	Helferplasmid (*vsv-g*)	3,8 µg

3.3.8 Titration zur Ermittlung der Infektiösität pseudo-lentiviraler Partikel

Um die Infektiösität der pseudo-lentiviralen Partikel zu ermitteln, wurde von jeder Ernte ein Aliquot aufgetaut und in einer Verdünnungsreihe auf murine NIH3T3-Zellen und humane HT1080-Zellen gegeben. Einen Tag vor der Transduktion wurden 20.000 Zellen/well in einer 48-well Zellkulturplatte ausgelegt. Für die Transduktion wurde der Virusüberstand in einer absteigenden Verdünnungsreihe mit DMEM+GlutaMAX, 10 % FKS, 1 % P/S vermischt. Das Transduktionsvolumen betrug 150 µl/ well. Jede Verdünnung wurde in Triplikaten angesetzt. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurde dem Transduktionsgemisch Hexadimethrinbromid (Polybren) in einer Endkonzentration von 5 µg/ml hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches die elektrische Abstoßung zwischen viralen Partikeln und der Zellmembran verringert [129].
Nach 24 h wurde das Transduktionsgemisch von den Zellen abgenommen, durch normales Vollmedium ersetzt, und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Da der Expressionsvektor die Gensequenz für GFP enthält, konnte die Anzahl der transduzierten Zellen mittels FACS ermittelt werden. Die Frequenz GFP^+ Zellen wurde für jede Verdünnungsstufe bestimmt. Der Virustiter wurde über nachfolgende Formel anhand einer Verdünnungsstufe berechnet, bei der multiple Infektionen ausgeschlossen werden konnten. Das so ermittelte Virusvolumen wurde einem MOI von 1 gleichgesetzt.

$$\text{MOI } 1 = \text{x mio. Zellen bei } 150\ \mu\text{l Virus} = \frac{(0{,}04\ \text{mio. Zellen x \% GFP + x Verdünnungsfaktor})}{100}$$

3.3.9 Transduktion von murinen und humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen

Einen Tag nach ihrer Isolation wurden die primären murinen und humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen transduziert. Hierfür wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit frischem Medium versetzt. Entsprechend der Zellzahl wurden pseudovirale Partikel (MOI 50), sowie Polybren (5 µg/ml) hinzugefügt. Für die Transduktion wurden die Zellen auf RetroNectin (6,6 µg in PBS/cm^2 über Nacht bei 4°C) beschichteten Zellkulturplatten ausgebracht. RetroNectin (TaKaRa) ist ein rekombinantes humanes Fibronektin-Fragment, welches Bindestellen sowohl für die viralen Partikel als auch für die Zellen bereitstellt. Dadurch werden die Zellen und die pseudo-viralen Partikel in engere räumliche Nähe zueinander gebracht und die Transduktionseffizienz gesteigert [130]. Die so ausgebrachten Zellen wurden für 90 min bei 1000 *g* und 32 °C „spin-okuliert“ [131].

Nach 24 h wurde das Transduktionsmedium abgenommen, durch normales Medium ersetzt und die Zellen bis zum Verwendungszeitpunkt kultiviert.

3.3.10 Transduktion von Zelllinien

HT1080 und NIH3T3 wurden 24 h vor Transduktion à $8*10^5$ Zellen/ T75 ausgelegt. Für die Transduktion wurde das Kulturmedium abgesaugt und 10 ml frisches Kulturmedium, versetzt mit pseudo-lentiviralen Partikeln (MOI 7), sowie Polybren (5 µg/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Transduktionsgemisch inkubiert und dann das Medium erneuert. Für die Transduktion zuvor mit siRNA transfizierter HT1080 Zellen wurden die Transduktionsvolumina dem 6-well Format angepasst.

Für die Transduktion von HL-60, wurden $2,5*10^6$ Zellen bei 400 *g* für 5 min. pelletiert und in 5 ml Kulturmedium, versetzt mit pseudo-lentiviralen Partikeln (MOI 10), sowie Polybren (5 µg/ml), aufgenommen und à 2,5 ml/ 6-well verteilt. 24 h nach Transduktion wurden die Zellen mit Medium gewaschen und pelletiert. Die Zellen wurden in 5 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und erneut à 2,5 ml/ 6-well verteilt. Die transduzierten HL-60 Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet ($1*10^6$ Zellen/ ml) und 14 Tage nach Transduktion GFP^+ Zellen mittels FACS sortiert und weiterkultiviert. Die Transgenexpression der transduzierten Kulturen wurde in regelmäßigen Abständen und zum Zeitpunkt des jeweiligen Versuchs mittels FACS kontrolliert.

3.3.11 Transfektion von siRNA

Für den *Knockdown* von p53 in HT1080 Zellen wurden siRNA-Pools der Firma Dharmacon, sowie das von Dharmacon für HT1080 empfohlene Transfektionsreagenz DharmaFect 4 verwendet. 5 nmol siRNA wurden entsprechend den Herstellerangaben in 250 µl 1x siRNA-Puffer gelöst und in Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

HT1080 Zellen wurden 24 h vor Transfektion à $3*10^5$ Zellen/ 6-well eingesät. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 35 nM siRNA (Endkonzentration) verwendet. 8 h nach Transfektion wurde das Transfektionsgemisch gegen frisches Kulturmedium beziehungsweise gegen das Transduktionsgemisch getauscht.

3.3.12 Fluoreszenz-basierte analytische Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der FACS-Analyse werden Zellen in einer Einzelzellsuspension basierend auf Streulicht und Fluoreszenzemission durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen werden dabei durch einen oder mehrere Laser mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und das gestreute beziehungsweise emittierte Licht gemessen. Passiert die Zelle den Lichtstrahl gibt das vorwärts gestreute Licht (Forward-scattered light, FSC) Auskunft über die Größe und das seitwärts gestreute Licht (Side-scattered light, SSC) Auskunft über die Granularität der Zelle. So kann bereits ohne die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zwischen verschiedenen Zelltypen innerhalb einer heterogenen Zellpopulation unterschieden werden (Abb. 6A). Markiert man die Zellen zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, können die Zellen anhand der Expression ihrer Oberflächenantigene weiter analysiert werden (Abb. 6B). Je nach Anzahl der Laser und Filter können unterschiedlich viele Parameter innerhalb einer Messung detektiert werden. In dieser Arbeit wurden zur FACS-Analyse von bis zu vier Fluoreszenzen pro Färbung ein FACSCalibur (BD) und bei der Analyse von mehr als vier Fluoreszenzen pro Färbung ein CyAn ADP Analyzer (Beckman Coulter) verwendet. Der CyAn ADP-Analyzer wurde freundlicherweise von Hr. Dr. Johannes Fischer (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

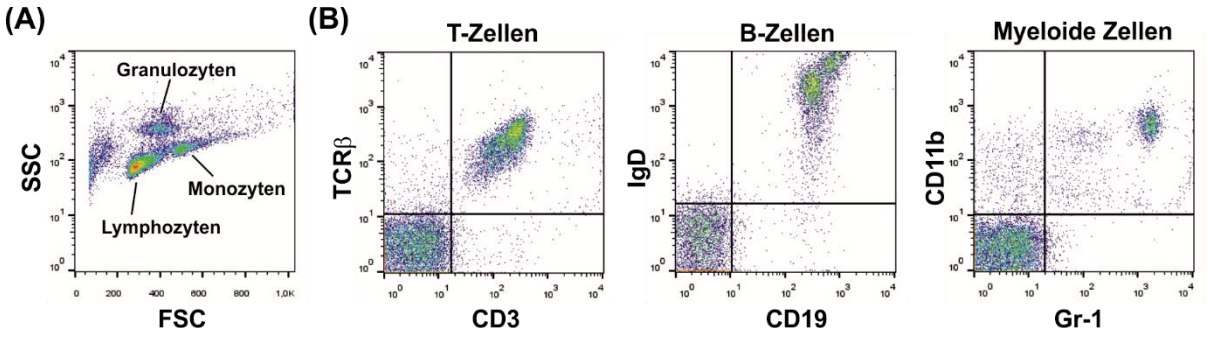

Abb. 6: FACS-Analyse von murinem peripherem Blut. (A) Differenzierung der Blutzellen anhand von Größe und Granularität. **(B)** Differenzierung der Blutzellen anhand von Zelltyp spezifischen Oberflächenmarkern.

3.3.12.1 Analyse von Oberflächenantigenen

Für die FACS-Analyse von Oberflächenantigenen und/oder GFP wurden die Zellen der Zellkultur entnommen oder aus den Organen der Maus präpariert (siehe 3.4.5) und mit PBS gewaschen. Pro Färbung wurden 1-5*10^5 Zellen eingesetzt und mit PBS auf 100 µl aufgefüllt. Von jedem Antikörper (1:10 - 1:50 verdünnt in PBS) wurden 5 µl zugefügt und für 15 - 20 min. im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS +

0,5 % FKS gewaschen und gemessen. Es wurden 2-20*10^4 Zellen pro Analyse aufgenommen und in der FlowJo Software ausgewertet. Für die Analyse der hämatopoetischen Organe der Maus wurden eigens zusammengestellte Antikörperpanel verwendet, deren Zusammenstellung im Anhang aufgeführt ist (siehe 7.1.11). Für das Stamm-/Progenitor-Zell-Panel wurden 4*10^6 Zellen in der Färbung eingesetzt und 2*10^6 Zellen aufgenommen. Da in dieser Färbung neben direkt Fluorophor gekoppelten Antikörpern auch Biotin-gekoppelte Antikörper (Lineage-Biotin und CD45.1-Biotin) eingesetzt wurden, wurden die Zellen nach der Färbung nur einmal gewaschen, wieder in 100 µl PBS aufgenommen und mit 10 µl Streptavidin-PerCP (1:50 in PBS) gegengefärbt (15 min., 4°C, im Dunkeln). Im Anschluss wurden die Zellen ebenfalls zweimal mit PBS + 0,5 % FCS gewaschen.

3.3.12.2 Zellzyklus-Analyse

Für die Zellzyklus-Analyse wurde der Nicoletti-Assay [132] verwendet, wobei die DNA durch Propidiumiodid (PI) angefärbt und mittels FACS detektiert werden kann. Hierfür wurden 3*10^5 Zellen in 300 µl Nicoletti-Puffer aufgenommen, für 10 min. bei RT inkubiert und direkt im FACS analysiert. Das Propidiumiodid bindet stöchiometrisch an die DNA, so dass das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zu der Menge an DNA ist. Je nach DNA-Menge kann man so zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2/M-Phase, >4n) unterscheiden (Abb. 7). Neben der Zellzyklus-Analyse ermöglicht der Nicoletti-Assay die Messung apoptotischer Zellen. Diese erscheinen aufgrund der geringeren und fragmentierten DNA-Menge als subG1 Peak.

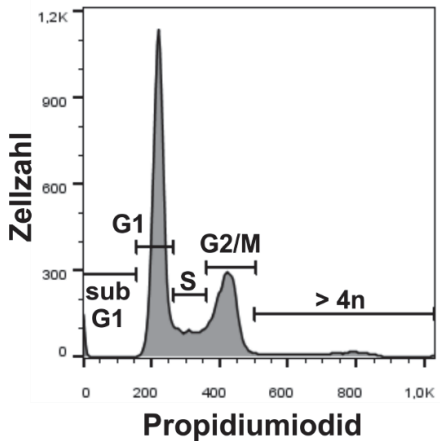

Abb. 7: Zellzyklusanalyse mittels FACS. Zellen werden mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen im FACS ermittelt. Propidiumiodid bindet stöchiometrisch an die DNA, so dass zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2/M-Phase, > 4n) unterschieden werden kann. Apoptotische Zellen erscheinen aufgrund der geringeren und fragmentierten DNA-Menge als subG1 Peak.

3.3.12.3 Zelltodanalyse mittels Annexin und 7-AAD

Zur Unterscheidung zwischen vitalen Zellen und Zellen in der frühen und späten Phase der Apoptose wurde das "*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit*" (BD) gemäß den Herstellerangaben verwendet. In der frühen Phase der Apoptose wird membrangebundenes Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf die Außenseite verlagert und kann über die Bindung von Annexin V detektiert werden. Da die Zellmembran jedoch noch intakt ist, kann der DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) nicht in die Zelle gelangen, so dass früh apoptotische Zellen zwar positiv für Annexin V, aber negativ für 7-AAD sind. In der späten Phase der Apoptose ist die Membranintegrität nicht mehr gegeben und die Zellen erscheinen positiv für beide Marker.

3.3.12.4 FACS-Sorting

Während analytische FACS-Geräte nur zur Messung der gefärbten Zellen dienen, können mithilfe eines Sorters die Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften sortiert werden. Zellsortierungen wurden in der "*Core Flow Cytometry Facility*" (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf durch Fr. Dipl. Ing. Katharina Raba an einem Hochgeschwindigkeitssorter "MoFlo XDP" (Beckman Coulter) durchgeführt. Für den Zellsort wurden die Zellen wie unter 3.3.12.1 beschrieben vorbereitet und in zuvor mit PBS oder Medium beschichteten Polypropylene-Tubes sortiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 *g* für 6 min. zentrifugiert und ihrer Verwendung nach entsprechend kultiviert oder aufgearbeitet.

3.3.13 Immunfärbung

Für die Immunfärbung wurden adhärente Zellen auf für die Zellkultur beschichteten Glas-Objektträgern (Falcon Chambered Cell Culture Slides, 8 well) ausgebracht und kultiviert. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min. bei RT mit 2 %iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bis zur Färbung in PBS + 1 % P/S/Amphotericin B (Thermo Fisher Scientific) bei 4°C gelagert. Für die Immunfärbung wurden die Zellen für 10 min. bei RT in 0,1 % Triton-X 100 in PBS permeabilisiert und für 30 min. in PBS + 5 % FKS geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (verdünnt in PBS + 2 % FKS) für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 min. mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper (in PBS + 2 % FKS), sowie Phalloidin, inkubiert.

Zum Schluss wurden die Zellen viermal für 5 min. mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium eingedeckt. Zum Aushärten wurden die eingedeckten Objektträger 24 h im Dunkeln bei RT und im Anschluss bei 4°C gelagert.

3.3.14 Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase Färbung

Zur Detektion von seneszenten Zellen wurde das "*Senescence Cells Histochemical Staining Kit*" (Sigma-Aldrich) verwendet. Der Nachweis beruht auf der histochemischen Färbung der β-Galaktosidase-Aktivität bei einem pH-Wert von 6.0, welche bei diesem pH-Wert nur in seneszenten Zellen zu finden ist. Hierfür wurden die Zellen subkonfluent in 12-well Platten ausgelegt und einen Tag später nach Herstellerangaben gefärbt. Die Färbung wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt und die β-Gal-positiven Zellen am nächsten Tag ausgezählt und mikroskopisch aufgenommen.

3.3.15 ATRA-induzierte Differenzierung von HL-60

Durch die Behandlung mit ATRA können einige AML-Zelllinien, darunter auch HL-60-Zellen, in reife Granulozyten differenziert werden [133, 134]. Für die ATRA-induzierte Differenzierung wurden HL-60 Zellen in 6-well Platten ausgelegt ($5*10^5$/ ml) und mit 1 µM oder 10 µM ATRA (gelöst in DMSO) über 72 h kultiviert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze durchgeführt, denen nur die entsprechende DMSO-Menge hinzugefügt wurde. Nach 72 h wurden die Zellen per FACS auf die Expression der Differenzierungsmarker CD11b und CD38 untersucht, sowie der Zellzyklus analysiert. Apoptose wurde über die Bestimmung Annexin V/7AAD$^+$ Zellen im FACS, sowie durch Messung der Caspase 3/7-Aktivität analysiert.

3.3.16 Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

Die Caspasen 3 und 7 sind Effektoren in der Apoptose-Induktion, weswegen ihre Aktivität als Apoptosemarker verwendet werden kann.
Caspase-Glo 3/7-Reagenz wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und in Aliquots bei -80°C gelagert. Vor Verwendung wurden die Aliquots aufgetaut und 1 h bei RT äquilibriert. Zur Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität wurden $1,5*10^4$ HL-60 Zellen in 80 µl/ 96-well (Nunc white Microwell 96F,cell-culture, Thermo Fisher Scientific) in Triplikaten ausgelegt und jeweils 80 µl Caspase-Glo 3/7-Reagenz hinzugefügt. Zur Ermittlung der

Hintergrundlumineszenz wurde 80 µl Zellkulturmedium statt Zellsuspension verwendet. Anschließend wurde die Platte in den Luminoskan Ascent 2.4 (Thermo Fisher Scientific) überführt und das Programm gestartet. Dies beinhaltet ein initales Schütteln (300 rpm, 30 s), gefolgt von 60 min. Inkubation bei 21°C. Im Anschluss wurde die Lumineszenz mit einer Integrationszeit von 1000 ms/ well gemessen. Die Hintergrundlumineszenz wurde von allen gemessenen Werten abgezogen.

3.3.17 *Screening* von Wirkstoff-Bibliotheken

Für die Testung der Wirkstoff-Bibliotheken wurden HL60[GFP] und HL60[HB9] Zellen in einer Konzentration von 30.000 Zellen/ 30µl in eine 384well Platte ausgelegt und für 72 h mit einer Verdünnungsreihe (0,005–25 µM in DMSO) des jeweiligen Wirkstoffes inkubiert. Zur Verfügung stand eine kommerziell erhältliche Sammlung von 80 Kinase-Inhibitoren (Tocriscreen #3514) und eine Sammlung von 193 Wirkstoffen, die in der Klinik zur Krebstherapie bereits Anwendung finden oder sich in Phase III bis IV Studien befinden. Die Bereitstellung der Wirkstoffbibliotheken, sowie die Durchführung des *Screenings* erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Hr. Dr. Marc Remke (DKTK Nachwuchsgruppe „Pädiatrische Neuroonkogenomik“; Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Düsseldorf).

Zum Ausplattieren der Zellen wurde der Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und zum Ausbringen der Wirkstoffe der Digital Dispenser D300e der Firma TECAN. Die Zellviabilität wurde anhand der ATP-Konzentration (CellTiter-Glo Assay, Promega) ermittelt. Hierbei wird mithilfe einer Luziferase-Reaktion die ATP-Menge bestimmt, welche direkt proportional zu der Anzahl metabolisch aktiver/vitaler Zellen ist. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte über den Multimode Microplate Reader Spark 10M (TECAN). Die für die einzelnen Verdünnungen gemessenen Lumineszenzwerte wurden zur entsprechenden DMSO-Menge normalisiert. Der Lumineszenzwert der Zellen inkubiert mit DMSO wurde als 100%ige Zellviabilität gesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu aufgetragen. Die Ermittlung des IC_{50} und des 95 % Konfidenzintervalles erfolgte mittels Graph Pad Prism unter Anwendung einer 4 Parameter nicht-linearen Regression.

3.4 Murines Transplantationsmodel

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des "Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV)" durchgeführt. Die Haltung der Tiere und die Versuchsdurchführung erfolgte in der "Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT)" der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

3.4.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in Empfängertiere

Für Transplantationen wurden die murinen Stamm- und Progenitorzellen einen Tag nach Transduktion abgelöst und gezählt. $5*10^4$ Zellen des Transplantates wurden für weitere 48 h kultiviert und anschließend die Frequenz GFP^+ Zellen per FACS bestimmt. Die zu transplantierenden Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen (300 *g*, 10 min., RT) und dann in 200-300 µl PBS für die Injektion aufgenommen.

Die zu transplantierenden Tiere wurden 24 h vor der Injektion myeloablativ (10 Gy; Biobeam GM 2000, Gamma-Service Medical GmbH) bestrahlt. Durch diese Bestrahlungsdosis wird das Knochenmark des Empfängertieres derart geschädigt, dass es nicht mehr in der Lage ist neue Blutzellen zu bilden. Dies soll dazu führen, dass das hämatopoetische System des Tieres nur von den Spender- und nicht von den eigenen Zellen rekonstituiert wird.

Direkt vor der Injektion wurden die Tiere für 10 Minuten unter eine Rotlicht-Wärmelampe gesetzt, um die Venen zu erweitern. Die Injektion wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Für die Dauer der Injektion wurde das jeweilige Empfängertier in einem Maus-*Restrainer* (Feinwerkstatt, HHU Düsseldorf) fixiert. Nach Desinfektion (Kodan) der geplanten Einstichstelle wurden > $1*10^5$ Stammzellen mit einer Insulin-Einmalspritze (27G) in eine der zwei oberen lateralen Schwanzvenen injiziert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen, die zu einer Embolie führen könnten, in die Vene gelangen und die Injektion mit einer mäßigen Geschwindigkeit durchgeführt wird. Nach der Injektion wurde die Einstichstelle mit einer sterilen Kompresse für einige Minuten abgedrückt, um ein Nachbluten zu verhindern.

3.4.2 Haltung transplantierter Tiere

Da in Folge der Bestrahlung das Immunsystem des Empfängertieres bis zur vollständigen Rekonstitution durch die Spenderzellen geschwächt ist, und um während der Versuchsdauer eine Beeinflussung des Immunsystems durch äußere Einflüsse zu vermeiden, wurden die Tiere

möglichst keimfrei gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer waren die Tiere in speziellen Filtertopkäfigen untergebracht, wobei das Käfiggitter von einer Haube abgedeckt ist, in die ein Grobfilter integriert ist. Dieser Grobfilter verhindert einen Partikelaustausch zwischen dem Käfiginneren und der Umgebung und erhöht so den Schutz der Tiere vor Keimen. Des Weiteren erhielten die Tiere nur autoklavierte Einstreu und Futter, sowie pathogenfreies Wasser (pH 2,0). Alle Arbeiten an den Tieren wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, unter Verwendung von Kittel, Mundschutz, Haube und Handschuhen. Zusätzlich wurden die Tiere eine Woche vor und drei Wochen nach Transplantation prophylaktisch mit einem Breitband-Antibiotikum behandelt, um eine mögliche Infektion zu vermeiden. Hierfür wurde Neomycin (1,1 g/L) über das Trinkwasser verabreicht und täglich erneuert.
Der Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und die Tiere zweimal die Woche gewogen, um den Allgemeinzustand zu protokollieren. Innerhalb eines Versuches lag die Beobachtungsdauer bei ca. 6 Monaten.

3.4.3 Blutabnahme

Alle 6-8 Wochen wurde den transplantierten Tieren Blut abgenommen, um den Verlauf der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems nachzuverfolgen. Hierfür wurden die Tiere mit Isofluran (Actavis) betäubt und der retrobulbäre Venenplexus mit einer Glaskapillare (KABE Labortechnik) punktiert. Die verwendeten Glaskapillaren waren auf der Innenseite mit Heparin beschichtet, um eine Koagulation des Blutes zu vermeiden. Pro Blutabnahme wurden einer Maus nicht mehr als 200 µl Blut entnommen, was ungefähr 10 % des Gesamtblutvolumens und somit dem zulässigen Entnahmevolumen bei mehrmaligen Abnahmen entspricht.

3.4.4 Präparation von murinen Blutzellen für die FACS-Analyse

Unmittelbar nach der Blutabnahme wurden die murinen Blutzellen für die FACS-Analyse vorbereitet. Für die Zellzahlbestimmung wurden 2 µl Blut mit 18 µl Türks-Lsg. (siehe 3.3.3) vermischt und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt. Für die FACS-Analyse wurde pro Färbung die Menge an Blut eingesetzt, die einer Zellzahl von $6*10^4$ entsprach, und mit PBS auf 100 µl aufgefüllt. Für die Färbung wurden 5 µl der entsprechenden Antikörperverdünnung hinzugefügt und das Blut für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Färbung wurde dem Blut-PBS-Gemisch das dreifache Volumen an hypotoner Ammoniumchlorid-Lösung (8,29 mg NH_4Cl, 1 mg $KHCO_3$, 0,0375 mg Na-EDTA ad 1 ml H_2O, pH 7,4) zugefügt und für

5 min. auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Im Anschluss wurde zweimal mit PBS + 0,5 % FKS gewaschen (400 *g*, 5 min., RT) und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Im Durchschnitt wurden $2*10^4$ Zellen pro Färbung aufgenommen.

3.4.5 Euthanasie der Versuchstiere, Organentnahme und Zellisolation

Für die Organentnahme wurden die Versuchstiere durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid euthanasiert. Es wurden Thymus, Milz und zur Gewinnung von Knochenmark die beiden Hinterläufe entnommen und bis zur direkt anschließenden Zellisolation in Medium auf Eis gelagert. Zur Zellisolierung wurden Thymus und Milz jeweils auf einem mit PBS befeuchteten 100 µm Filtersieb mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze zerrieben. Anschließend wurde der Filter mehrmals mit PBS gespült. Die Zellsuspension wurde erneut über ein 70 µm Filtersieb gegeben, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (400 *g*, 5 min., RT). Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet der Milz in 1 ml PBS aufgenommen, mit dem dreifachem Volumen an hypotoner NH_4Cl-Lösung versetzt und für 5 min. auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Da sich im Thymus keine Erythrozyten befinden, konnte dieser direkt nach der ersten Zentrifugation in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt werden. Das Knochenmark wurde wie unter 3.3.3 beschrieben aus Femur und Tibia isoliert, anstatt MACS-Puffer wurde PBS verwendet und das Knochenmark wie für die Milz beschrieben einer Erythrozytenlyse unterzogen. Nachdem die entsprechenden Zellmengen für die FACS-Analyse abgenommen waren, wurden die restlichen Zellen pelletiert, in Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5 Statistik

Für statistische Analysen wurde, wenn nicht anders angegeben, der *Student´s t-test* verwendet. Signifikanzen sind wie folgt gekennzeichnet: *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von HB9 auf das Expressionsprofil CD34$^+$ HSPZ

Die aberrante Expression von HB9 stellt zur Zeit das einzig bekannte Charakteristikum aller Translokation t(7;12)-positiver AML-Patienten dar. Ob und inwiefern die Expression von HB9 zu der Leukämieentstehung beiträgt ist bisher jedoch nicht bekannt.
Da es sich bei HB9 um einen Transkriptionsfaktor handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die aberrante Expression von HB9 zu Veränderungen in der Genexpression führt.
Um zu untersuchen, welchen Einfluss HB9 auf das Expressionsprofil von HSPZ nimmt und dadurch zur Leukämogenese Translokation t(7;12)-positiver AML beitragen könnte, wurden CD34$^+$ HSPZ mit HB9 oder dem Kontrollvektor lentiviral transduziert und Unterschiede in der Genexpression mittels RNAseq analysiert.

4.1.1 Funktioneller Nachweis der lentiviralen Expressionskonstrukte

Zur Expression von HB9 in CD34$^+$ HSPZ wurde ein lentivirales Expressionssystem etabliert, da sich Lentiviren hervorragend für die stabile Integration von Fremd-DNA in primäre hämatopoetische Zellen eignen [124].
Bei den verwendeten lentiviralen Expressionsvektoren handelt es sich um ein bicistronisches Expressionssystem mit Co-Expression von HB9 und GFP (Abb. 8A; siehe 7.1.17). Ausgehend von dem Promotor werden beide Gene als ein Transkript synthetisiert. Die Separation von HB9 und GFP erfolgt über eine 2A-*Site* bei der Translation [135], so dass die Zellen nur dann GFP$^+$ sind, wenn zuvor das HB9-Protein translatiert wurde. Als Promotor wurde der *Elongation factor*-1α (EF1) Promotor ausgewählt, da dieser im Gegensatz zu anderen Promotoren nicht epigenetisch inaktiviert werden kann und zugleich eine physiologische Expressionsstärke in hämatopoetischen Zellen erzeugt [136]. Als Negativkontrolle wurde der GFP-Leervektor verwendet.
Die Funktionalität der lentiviralen Konstrukte wurde im Zelllinienmodel an HT1080 Zellen überprüft. Mittels FACS-Analyse konnte die Expression von GFP sowohl bei HB9 als auch bei Leervektor transduzierten HT1080 Zellen (HT1080[HB9] beziehungsweise HT1080[GFP]) nachgewiesen werden (Abb. 8B). Westernblot-Analysen bestätigten die Korrelation von HB9 und GFP Expression (Abb. 8C).

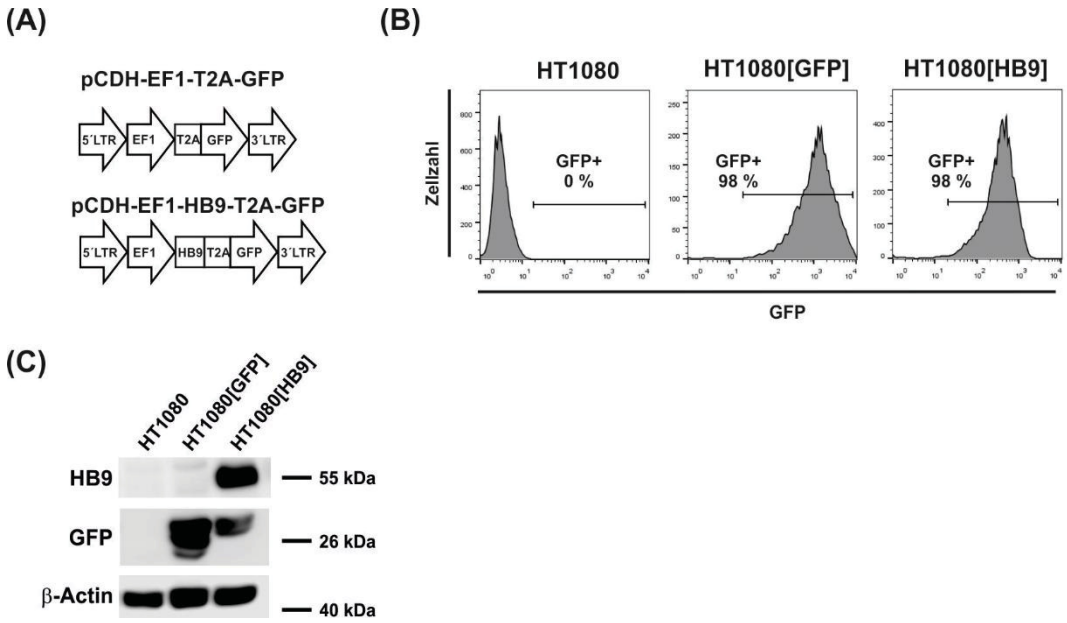

Abb. 8: Funktionsnachweis der lentiviralen Konstrukte. (A) Schematische Darstellung der Expressionskassetten der lentiviralen pCDH-Vektoren. Dargestellt sind der Leervektor pCDH-EF1-T2A-GFP [GFP] und der HB9 Vektor pCDH-EF1-HB9-T2A-GFP [HB9]. **(B)** HT1080 Zellen wurden mit einem MOI von 7 mit pseudo-lentiviralen Partikeln für [GFP] und [HB9] transduziert und nach 72 h auf die Expression von GFP mittels FACS analysiert. **(C)** Westernblot-Analyse zur Überprüfung der Proteinexpression von HB9 und GFP in den transduzierten HT1080 Zellen.

4.1.2 Gewinnung CD34$^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut

Als Quelle für die Isolation CD34$^+$ HSPZ wurde Nabelschnurblut verwendet, welches freundlicherweise von Fr. Prof. Dr. Kögler (José Carreras Stammzellbank, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Mononukleäre Zellen wurden über Dichtegradientenzentrifugation aus dem Nabelschnurblut isoliert und CD34$^+$ HSPZ über immunmagnetische Selektion angereichert.

Um die Reinheit der angereicherten Zellfraktion zu überprüfen wurden vor und nach jeder Anreicherung Zellen für die FACS-Analyse entnommen und auf die Expression der Oberflächenmarker CD45, CD34 und CD38 analysiert (Abb. 9). CD45 fungiert als Pan-Leukozyten-Marker, während CD34 nur von HSPZ exprimiert wird. Anhand der Expression von CD38 kann zwischen Stamm- (CD34$^+$, CD38$^-$) und Progenitor- (CD34$^+$, CD38$^+$) Zellen unterschieden werden [137]. Vor der immunmagnetischen Anreicherung lag der Anteil CD34$^+$ Zellen bei ungefähr 1 %. Deutlich zu erkennen ist, dass die CD34$^+$ HSPZ eine geringere Expression von CD45 aufweisen als ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen. Die CD45$^-$ negative Zellpopulation beinhaltet Erythrozyten, sowie nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen anderer Gewebe [138].

Nach der ersten Affinitätsaufreinigung lag der Anteil $CD34^+$ Zellen bei lediglich ~50 %, weswegen eine weitere Anreicherung notwendig war. Durch eine zweite Anreicherung konnte der Anteil $CD34^+$ Zellen auf über 85 % erhöht werden. Im Durchschnitt konnten so aus 100 ml Nabelschnurblut 1,6 x 10^6 $CD34^+$ Zellen isoliert werden.

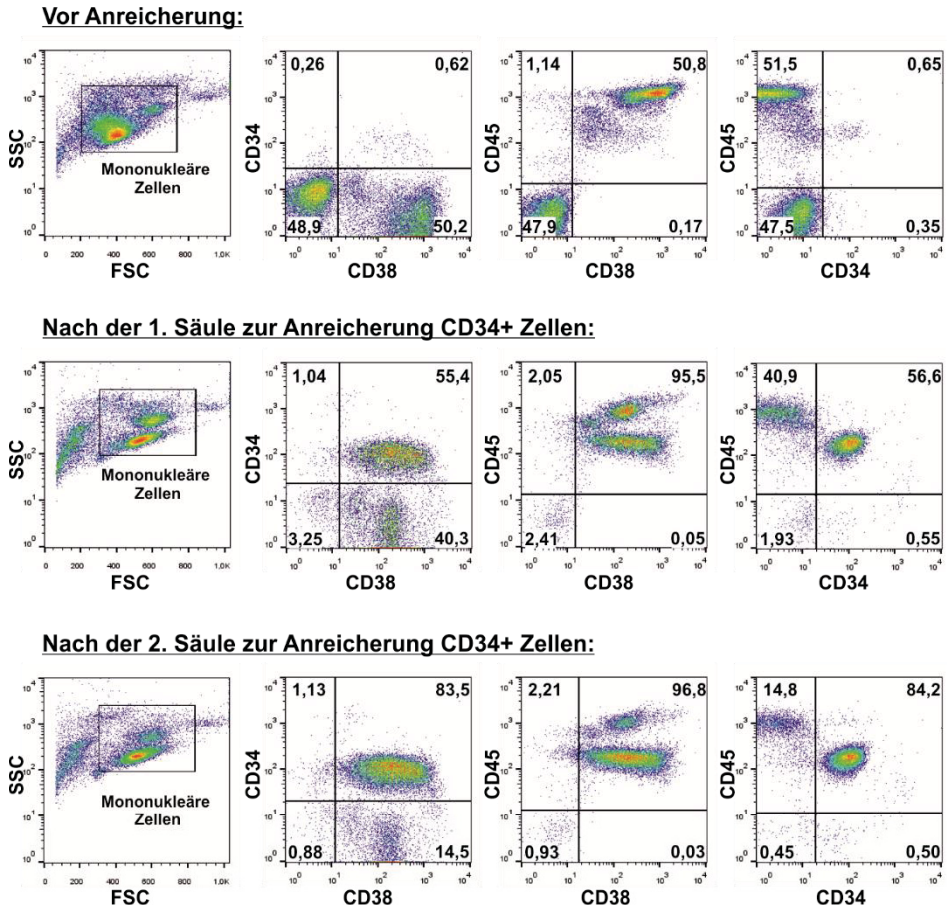

Abb. 9: Immunmagnetische Anreicherung von $CD34^+$ HSPZ. Mononukleäre Zellen wurden über Dichtegradientenzentrifugation aus Nabelschnurblut isoliert und immunmagnetisch (MACS) auf den Oberflächenmarker CD34 angereichert. Die angereicherten Zellen wurden vor und nach jeder immunmagnetischen Säule auf die Expression der Oberflächenmarker CD34, CD38 und CD45 im FACS analysiert, um den Reinheitsgrad der Aufreinigung zu bestimmen. CD45 fungiert als Pan-Leukozyten-Marker, während über die Oberflächenmarker CD34 und CD38 zwischen Stamm- ($CD34^+CD38^-$) und Progenitor-($CD34^+CD38^+$) Zellen unterschieden werden kann.

4.1.3 Lentivirale Transduktion $CD34^+$ HSPZ

Einen Tag nach ihrer Isolation wurden die $CD34^+$ HSPZ mit einem MOI von 50 lentiviral transduziert und 72 h nach Transduktion auf die Expression von GFP mittels FACS analysiert. Die Transduktionsrate lag bei den mit Leervektor transduzierten HSPZ (CD34[GFP]) bei 16-32 %, und bei den mit HB9 transduzierten HSPZ (CD34[HB9]) bei 10–15 % (Abb. 10A).

Aufgrund der geringen Transduktionseffizienz wurden die GFP$^+$ Zellen für die nachfolgende Genexpressionsanalyse mittels FACS sortiert.

Zum Zeitpunkt der Zellsortierung lag der Anteil CD34$^+$ Zellen bei über 86 % (Abb. 10A).

Über qRT-PCR konnte die Expression von HB9 in CD34[HB9] bestätigt werden, während in CD34[GFP] keine HB9 Expression nachweisbar war (Abb. 10B, C).

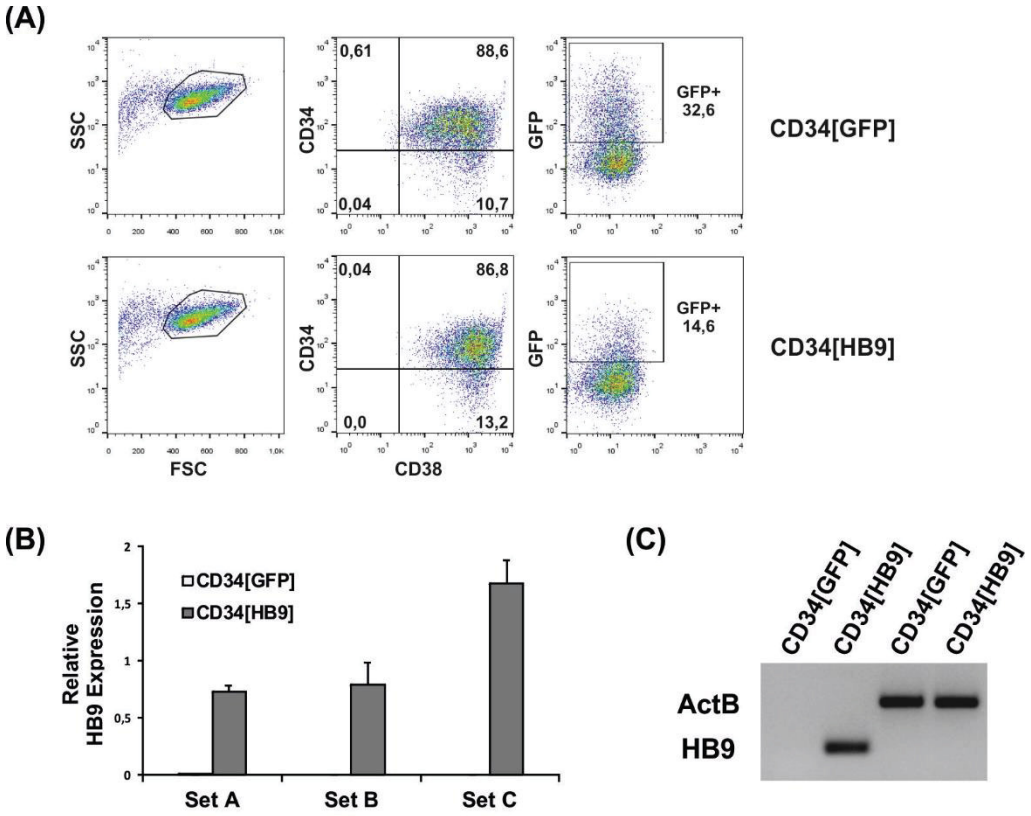

Abb. 10: Transduktion CD34$^+$ HSPZ. (A) CD34$^+$ HSPZ wurden mit einem MOI von 50 mit dem Leervektor (CD34[GFP]) oder HB9 (CD34[HB9]) transduziert und 72 h später erneut auf die Oberflächenmarker CD34/CD38 mittels FACS analysiert und auf GFP-Expression sortiert. **(B)** qRT-PCR zur Untersuchung der HB9 Expression in sortierten CD34$^+$ GFP$^+$ Zellen (n=3). Die HB9-Expression wurde normalisiert zu β-Aktin. **(C)** Auftragung der HB9 und β-Aktin qRT-PCR aus (B) auf ein Agarosegel.

4.1.4 Expressionsanalyse mittels RNAseq

Um den Einfluss der HB9 Expression auf das Expressionsprofil von HSPZ zu untersuchen, wurde die Genexpression von CD34[GFP] und CD34[HB9] mittels RNAseq analysiert.

Für die RNAseq-Analyse wurden unabhängig voneinander drei Nabelschnurblut-Proben aufgearbeitet und die isolierten CD34$^+$ Zellen lentiviral mit HB9 oder dem Leervektor transduziert. Es wurden nur Proben verwendet, deren Reinheit an CD34$^+$ Zellen nach der

Anreicherung bei ≥ 85 % lag und deren RNA einen RIN Score von über 9,5 aufwies (vgl. 3.2.13).

Die RNAseq-Analyse ergab im Durchschnitt 35.854.673 Reads pro Probe, von denen 84,4 % aligniert werden konnten. Der *Phred*-Score lag im Durchschnitt bei über 35 und ergibt somit eine Readgenauigkeit von > 99,9 %.

Die Genexpressionsanalyse ergab, dass in CD34[HB9] im Vergleich zu CD34[GFP] 824 Gene differentiell exprimiert waren ($p \leq 0{,}05$; Gesamtanzahl normalisierter Reads ≥12), von denen 437 Gene (53 %) hoch- und 387 Gene (47 %) herunterreguliert waren. Anhand der hierarchischen Clusteranalyse kann gezeigt werden, dass die CD34[HB9] sowie die CD34[GFP] Proben jeweils zusammen gruppieren (Abb. 11).

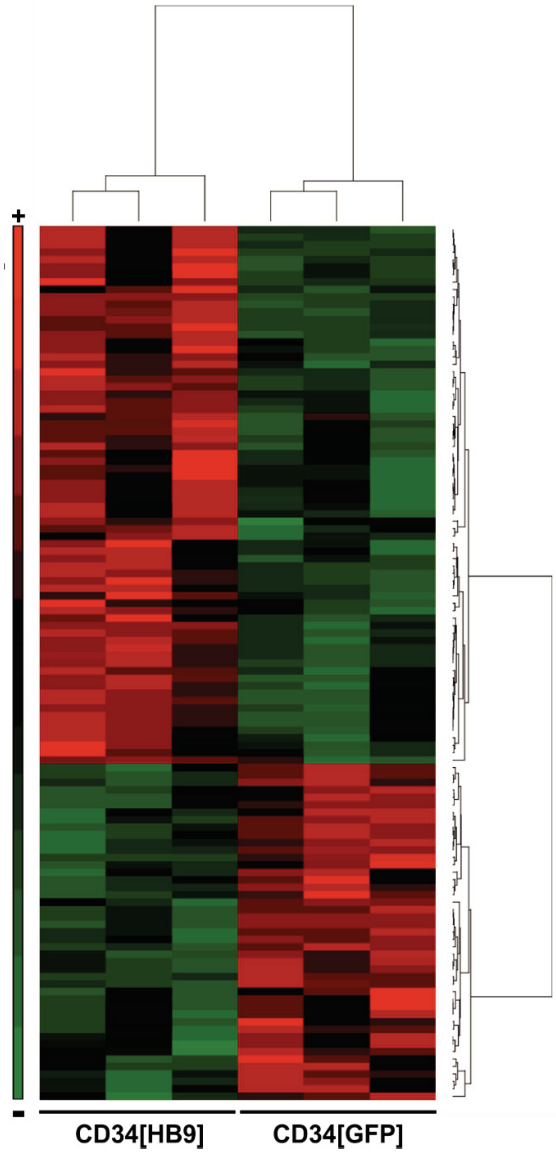

Abb. 11: Hierarchische Cluster-Analyse der durch HB9 differentiell regulierten Gene in CD34$^+$ HSPZ. Die Heatmap basiert auf 10 % aller zwischen CD34[GFP] und CD34[HB9] differentiell regulierten Gene mit einem p-Wert ≤ 0,05. Hoch regulierte Gene sind in rot und herunter regulierte Gene sind in grün dargestellt.

Des Weiteren kann man der Clusteranalyse entnehmen, dass durch HB9 hochregulierte Gene zu einem größeren Anteil an der Gruppierung von CD34[HB9] beitragen als herunterregulierte Gene.

Von den 117 Genen, die einen *fold change* (FC) von ≥ 1,8 aufweisen, sind 72 Gene (62 %) hoch- und 45 Gene (38 %) herunterreguliert (Tab. 16). Das Gen mit dem größten FC ist wie zu erwarten HB9/MNX1, wodurch die Expression des Transgens bestätigt wird.

Unter den am stärksten hochregulierten Genen befinden sich sechs Gene, deren Transkription durch HB9 *de novo* initiiert wird, gemessen an einer durchschnittlichen *Read* Anzahl von <1 bei CD34[GFP] und >5 bei CD34[HB9]. Dazu gehörten: *Hemoglobin subunit zeta (HBZ), Metallothionein 1G (MT1G), Solute Carrier Family 4 Member 1 (SLC4A1*), *Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI), Metallothionein 1X (MT1X)* und *C-C Motif Chemokine Ligand 22 (CCL22)*. Sowohl für Hämoglobine als auch für Metallothioneine zeigte die Analyse eine Anreicherung weiterer Vertreter der Genfamilie, die hochreguliert waren (*HBA1, HBA2, HBE1, HBG2, HBQ1, HBD, MT2A*).

Mit einem FC von -8,2 war *Ryanodine Receptor 3 (RYR3*) mit Abstand das am stärksten herunter regulierte Gen.

Die differentiell regulierten Gene wurden einer *Gene Ontology* (GO)-Term Analyse unterzogen, um Aufschluss über durch HB9 veränderte biologische Prozesse zu erlangen.

Die Analyse ergab 48 positiv und 27 negativ regulierte GO-Terms mit einem p-Wert von ≤ 0,05. Molekulare Interaktionen der GO-Terms wurden mithilfe der Software Cytoscape visualisiert (Abb. 12). Die positiv regulierten GO-Terms ordneten sich in vier Netzwerken an, von denen das Größte biologische Prozesse wie „*Cellular Biosynthetic Process*“, „*RNA Processing*“ und „*Cellular Component Assembly*“ umfasste.

Positiv regulierte GO-Terms, die sich dem Zellzyklus zuordnen lassen, wie „*Cell Cycle GO 0007049*“, „*Cell Cycle Process*“, „*M Phase of Mitotic Cell Cycle*“ und „*Mitosis*“ bildeten das dichteste Netzwerk. Dieses Netzwerk stand in Verbindung zu Prozessen, die DNA-Metabolismus umfassen, wie „*DNA Replication*“ und „*DNA Metabolic Process*“.

Die negativ regulierten GO-Terms bildeten ein großes Cluster, dass sich in vier Subgruppen unterteilen lässt: „*Multicellular Organismal Development*“, „*Cytoskeleton Organization and Biogenesis*“, „*Post Translational Protein Modification*“ und „*Intracellular Signaling Cascade*“. Bei den intrazellulären Signalwegen hob sich insbesondere das cAMP-assoziierte *Signaling* hervor.

Tab. 16: Liste der durch HB9 in CD34$^+$ HSPZ differentiell regulierten Gene. Angezeigt sind hoch- (rot) beziehungsweise herunter- (grün) regulierte Gene mit $p \leq 0{,}05$ und einem FC $\geq 1{,}8$.

Chr.	Gen	p-Wert	FC	Chr.	Gen	p-Wert	FC
7	MNX1	2,37E-06	1998,36	11	MPZL2	4,91E-02	1,94
16	HBZ	1,18E-04	259,25	10	MYOF	3,11E-02	1,93
16	MT1G	4,86E-03	67,76	1	SLC2A5	1,13E-02	1,92
17	SLC4A1	2,19E-04	27,29	22	GGT5	4,82E-02	1,92
20	BPI	4,21E-02	27,14	7	FAM188B	9,39E-03	1,91
16	MT1X	4,50E-03	21,04	21	JAM2	4,65E-02	1,90
7	AQP1	4,28E-03	18,10	15	CTSH	3,40E-02	1,90
8	FAM83A	1,38E-02	15,47	1	PADI4	4,00E-02	1,89
16	CCL22	4,10E-02	12,99	10	CDH23	4,39E-02	1,87
16	HBA2	1,24E-02	12,37	16	NOL3	3,16E-02	1,85
16	HBA1	1,38E-03	12,09	4	JCHAIN	1,07E-02	1,85
16	MT2A	1,66E-02	9,79	19	ICAM1	2,37E-02	1,84
19	PALM3	1,44E-03	8,63	11	HBD	4,05E-03	1,82
19	C3	3,72E-03	8,15	14	PTGER2	7,38E-03	-1,80
5	ADAM19	5,54E-03	6,74	8	CYP7B1	4,87E-02	-1,81
14	SLC7A8	7,73E-03	5,77	15	RAD51-AS1	1,94E-02	-1,81
20	MMP9	7,31E-03	5,46	9	PIP5K1B	6,04E-03	-1,81
2	IGFBP5	2,25E-02	5,44	6	SYTL3	1,48E-03	-1,84
X	ALAS2	6,95E-04	5,17	6	MYLK4	2,59E-03	-1,86
14	ASB2	1,59E-03	4,78	1	LAX1	4,37E-03	-1,86
19	SEMA6B	7,29E-03	4,78	3	LXN	6,66E-04	-1,87
11	HBE1	1,92E-02	4,55	10	FAM171A1	2,73E-02	-1,87
6	CD24	3,66E-02	4,36	12	PDE3A	4,73E-02	-1,87
17	HIC1	9,66E-03	4,26	2	TRIB2	2,19E-03	-1,87
8	NEFM	3,12E-03	4,00	3	SLC9A9	3,97E-02	-1,89
11	LRRC32	1,66E-02	3,50	8	DLC1	5,42E-03	-1,90
8	DUSP4	3,44E-04	3,38	1	SPTA1	4,01E-02	-1,91
11	TSPAN18	1,18E-02	3,19	18	RAB27B	3,26E-03	-1,93
2	LONRF2	1,76E-03	3,12	4	LEF1	3,15E-02	-1,98
20	THBD	3,77E-02	2,96	11	VWA5A	3,83E-02	-2,00
2	NMUR1	1,23E-02	2,79	2	FAM178B	2,93E-02	-2,01
4	NAT8L	4,72E-03	2,76	1	FCER1A	3,08E-02	-2,02
19	LILRB4	2,20E-02	2,68	19	PLVAP	8,93E-03	-2,05
3	PLXNA1	2,46E-02	2,65	2	LTBP1	3,62E-03	-2,05
21	PDE9A	2,07E-03	2,65	8	FZD3	1,12E-02	-2,06
10	IL2RA	5,17E-03	2,56	1	TGFBR3	1,96E-02	-2,12
1	SLC30A1	1,58E-02	2,48	8	IL7	2,35E-03	-2,12
6	LTB	7,09E-03	2,47	4	HPGD	3,28E-02	-2,13
16	ADGRG5	1,69E-02	2,47	6	CNKSR3	4,89E-03	-2,13
2	GPR35	1,65E-02	2,43	2	DPP4	4,73E-02	-2,14
3	EPHB3	1,01E-03	2,43	8	CA1	4,07E-02	-2,23
22	A4GALT	1,44E-02	2,43	18	SLC14A1	1,73E-02	-2,24
5	CD180	5,66E-03	2,41	9	TEK	4,82E-02	-2,25
17	CCR7	7,60E-03	2,39	7	CD36	3,16E-03	-2,36
16	ADGRG3	6,49E-03	2,38	7	DPY19L2P1	3,62E-02	-2,40
17	ABI3	3,55E-02	2,38	17	CDRT4	3,62E-02	-2,45
X	VSIG4	6,53E-03	2,36	16	CALB2	4,27E-02	-2,62
6	IRF4	9,49E-03	2,23	1	PCSK9	8,62E-03	-2,72
16	HBQ1	5,32E-03	2,23	12	SLC2A14	1,40E-02	-2,80
2	MYO1B	2,49E-02	2,20	7	ITGB8	1,05E-02	-2,84
11	HBG2	1,88E-02	2,15	15	FBN1	6,33E-04	-2,88
14	SERPINA1	3,85E-02	2,15	6	PLEKHG1	8,76E-03	-3,13
1	DHRS3	2,39E-02	2,14	6	CRISP3	4,13E-02	-3,28
10	TSPAN15	1,89E-02	2,14	13	TNFRSF19	1,92E-02	-3,45
7	UPP1	2,79E-02	2,11	19	CLC	7,07E-04	-3,47
17	LGALS3BP	3,58E-02	2,07	9	FREM1	4,57E-02	-3,55
12	TESC	8,48E-03	2,05	17	FOXJ1	1,95E-03	-3,99
12	ITGB7	1,68E-02	2,05	15	RYR3	1,63E-02	-8,21
11	HBBP1	6,68E-04	2,02				

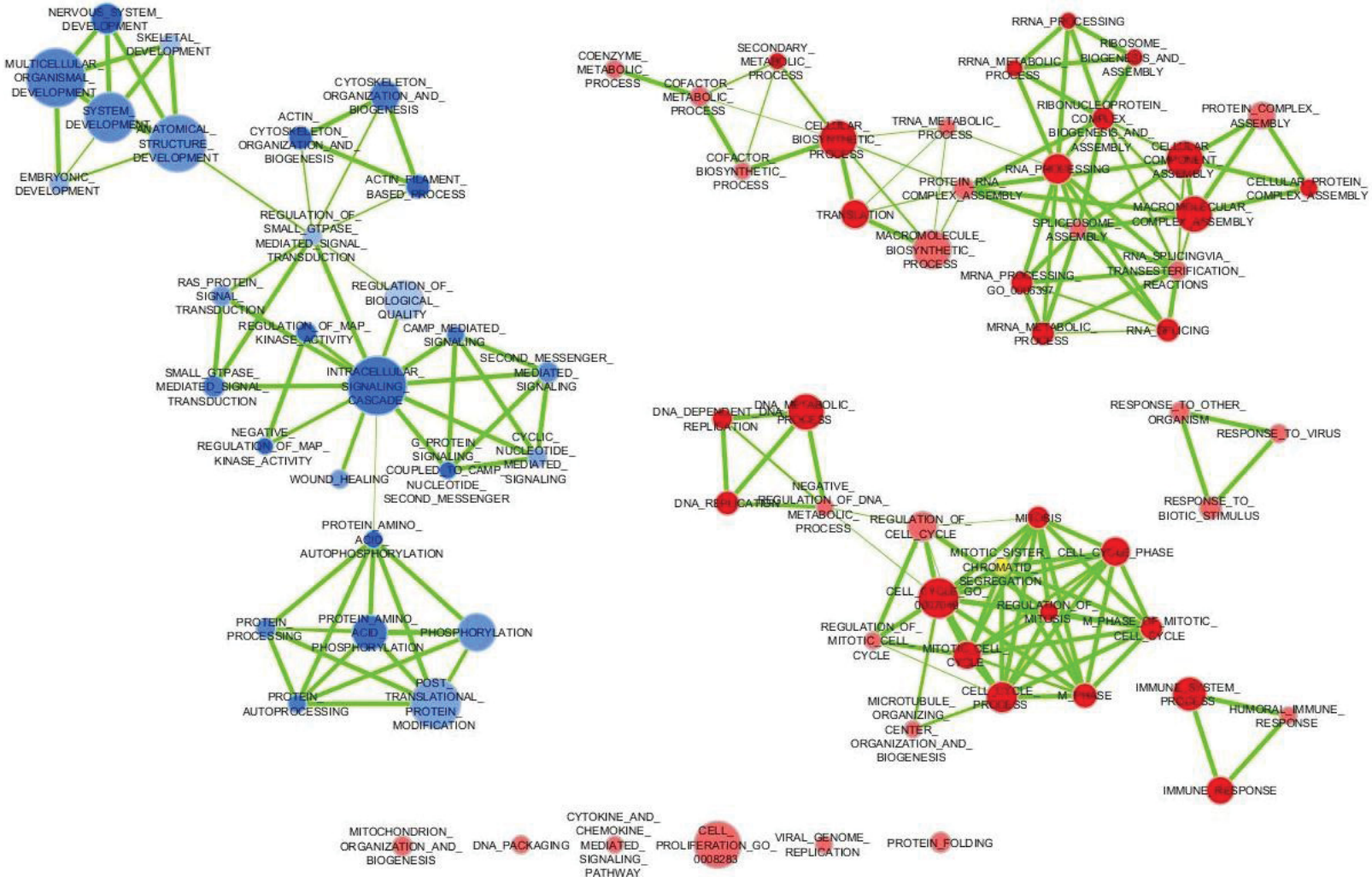

Abb. 12: Netzwerkdarstellung der GO-Term Analyse von CD34[HB9]. Visualisierung der GO-Term Analyse mittels Cytoscape. Dargestellt sind alle GO-Terms mit einem p-Wert ≤ 0,05. Negativ regulierte GO-Terms sind in Blau, positiv regulierte GO-Terms in Rot dargestellt. Verknüpfungen der GO-Terms sind über Linien dargestellt.

Als nächstes wurden die GO-Terms anhand des *Normalized Enrichment Scores* (NES) analysiert (Tab. 17), welcher die Frequenz der differentiell regulierten Gene in Bezug zur GO-Term Größe normalisiert. Je größer der NES, desto mehr Gene innerhalb des GO-Terms sind differentiell reguliert. Hierfür wurden nur GO-Terms mit einem p-Wert ≤ 0,01 verwendet.

Tab. 17: Liste der durch HB9 in CD34$^+$ HSPZ differentiell regulierten GO-Terms. Dargestellt sind positiv regulierte (rot), sowie negativ regulierte GO-Terms (blau) mit einem p-Wert ≤ 0,01, sortiert nach NES. Die Durchführung erfolgte mittels *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA).

GO-Term	NES	p-Wert
M_PHASE	20,90	<0,0001
M_PHASE_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	20,83	<0,0001
MITOSIS	20,50	<0,0001
RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX_BIOGENESIS_AND_ASSEMBLY	19,77	<0,0001
RNA_SPLICING	19,67	<0,0001
RIBOSOME_BIOGENESIS_AND_ASSEMBLY	19,66	<0,0001
DNA_REPLICATION	19,10	<0,0001
RRNA_PROCESSING	18,92	0,0026
RRNA_METABOLIC_PROCESS	18,69	0,0028
CELLULAR_PROTEIN_COMPLEX_ASSEMBLY	18,19	<0,0001
RNA_PROCESSING	18,11	<0,0001
SECONDARY_METABOLIC_PROCESS	17,96	0,0018
REGULATION_OF_MITOSIS	17,76	0,0035
CYTOKINE_AND_CHEMOKINE_MEDIATED_SIGNALING_PATHWAY	17,24	0,0088
CELL_CYCLE_GO_0007049	17,04	<0,0001
DNA_METABOLIC_PROCESS	16,61	<0,0001
MRNA_METABOLIC_PROCESS	16,48	0,0043
CELL_CYCLE_PHASE	16,42	<0,0001
TRANSLATION	16,34	0,0008
MITOTIC_CELL_CYCLE	16,23	0,0016
RESPONSE_TO_OTHER_ORGANISM	16,19	0,0059
COFACTOR_METABOLIC_PROCESS	16,18	0,0095
PROTEIN_RNA_COMPLEX_ASSEMBLY	15,85	0,0100
IMMUNE_RESPONSE	15,26	0,0024
CELLULAR_COMPONENT_ASSEMBLY	15,06	<0,0001
IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	14,98	0,0048
CELLULAR_BIOSYNTHETIC_PROCESS	14,95	0,0024
MACROMOLECULAR_COMPLEX_ASSEMBLY	14,78	0,0016
INTRACELLULAR_SIGNALING_CASCADE	-13,37	0,0016
MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT	-13,38	0,0031
PHOSPHORYLATION	-14,53	0,0042
NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	-15,18	<0,0001
PROTEIN_AMINO_ACID_PHOSPHORYLATION	-15,47	0,0014
REGULATION_OF_MAP_KINASE_ACTIVITY	-15,93	0,0093
PROTEIN_AMINO_ACID_AUTOPHOSPHORYLATION	-17,08	0,0058
RAS_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	-17,27	0,0047
WOUND_HEALING	-17,65	0,0046
PROTEIN_PROCESSING	-17,72	0,0033
G_PROTEIN_SIGNALING_COUPLED_TO_CAMP_NUCLEOTIDE_SECOND_MESSENGER	-17,89	0,0057
SMALL_GTPASE_MEDIATED_SIGNAL_TRANSDUCTION	-18,05	0,0023
NEGATIVE_REGULATION_OF_MAP_KINASE_ACTIVITY	-18,37	0,0056
PROTEIN_AUTOPROCESSING	-18,43	0,0023
ACTIN_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	-18,44	<0,0001
ACTIN_FILAMENT_BASED_PROCESS	-18,76	<0,0001

Den größten NES wiesen die GO-Terms „*M Phase*“, „*M Phase of Mitotic Cell Cycle*“ und „*Mitosis*“ auf. Die Anreicherung von sechs weiteren Zellzyklus-assoziierten GO-Terms (*DNA Replication, Regulation of Mitosis, Cell Cycle GO 0007049, DNA Metabolic Process, Cell Cycle Phase, Mitotic Cell Cycle*) bestätigt die Signifikanz dieses Netzwerks. Die am stärksten negativ regulierten GO-Terms waren der Aktin-Zytoskelett-Organisation zugeordnet. Weiterhin bestätigte sich die negative Anreicherung von intrazellulären Signalkaskaden.

Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte ein negativ regulierender Einfluss von HB9 auf G-Protein gekoppeltes cAMP-*Signaling* bereits nachgewiesen werden [104]. In einer stabil mit HB9 transfizierten AML-Zelllinie (HL-60) wurde gezeigt, dass HB9 über direkte Promotor-Interaktion die Expression des G-Protein gekoppelten Rezeptors *PTGER2* reprimiert, wodurch das cAMP-*Signaling* reduziert wurde [104]. Die durch HB9 verringerte Expression von *PTGER2* konnte zudem in Translokation t(7;12)-positiven AML-Patienten validiert werden.

Die RNAseq Analyse zeigte, dass auch in CD34[HB9] im Vergleich zu CD34[GFP] die Expression von *PTGER2* signifikant reduziert war (FC: -1,8; p-Wert: 0,0074). Neben *PTGER2* konnte eine Verringerung in der Expression von *Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-NAD* (*HPGD*) detektiert werden (FC: -2,1; p-Wert: 0,033). Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches intrazellulär für den Abbau von PGE2 verantwortlich ist. Die verringerte Expression von *PTGER2* und *HPGD* in CD34[HB9] konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden (Abb. 13). Die Expression von *HPGD* war 3,2-4,6 fach und die von *PTGER2* 2–4 fach in CD34[HB9] im Vergleich zu CD34[GFP] reduziert.

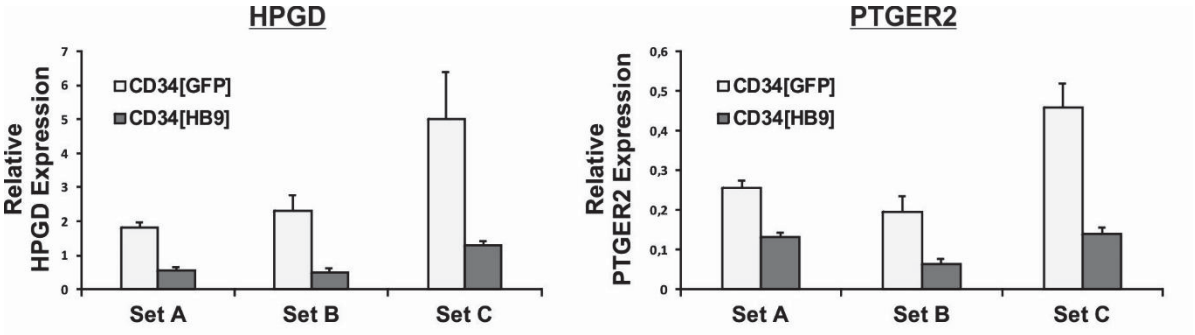

Abb. 13: qRT-PCR Validierung der verringerten Expression von *HPGD* und *PTGER2* in CD34[HB9]. Die Expression von *HPGD* und *PTGER2* wurde in CD34[HB9] und CD34[GFP] über qRT-PCR untersucht (n=3). Dargestellt ist die Expression in Relation zu β-Aktin.

4.2 Untersuchungen zum Einfluss von HB9 auf die Zellphysiologie

4.2.1 Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus

Aufgrund der signifikanten Anreicherung von Zellzyklus bezogenen Prozessen in der GO-Term Analyse wurde angenommen, dass die Expression von HB9 einen Einfluss auf die Zellproliferation haben könnte. Nachfolgend wurden Proliferations- und Zellzyklusanalysen durchgeführt, um diese Hypothese zu untersuchen. Hierfür wurden speziesübergreifend humane HT1080 und murine NIH3T3 Zellen verwendet. Sowohl HT1080 als auch NIH3T3 sind bereits in unterschiedlichen Studien zur Untersuchung von Proliferation und Zellzyklus verwendet worden [139-141] und eigneten sich somit als Modell für die geplanten Versuche.
HT1080 und NIH3T3 wurden lentiviral mit den bereits beschriebenen Konstrukten [HB9] oder [GFP] transduziert. Durch Verwendung eines MOI von 7 wurde in beiden Zellsystemen eine Transduktionseffizienz von ≥ 90 % erzielt (Abb. 14A) und wurde nachfolgend in allen Experimenten mit diesen beiden Zelllinien verwendet. Sowie für die HT1080 Zellen (vgl. Abb. 8C) konnte auch für die murinen NIH3T3 Zellen gezeigt werden, dass die GFP-Expression in den HB9-GFP transduzierten Zellen mit der HB9 Expression korreliert (Abb. 14B). Analog zu HT1080 konnte HB9 nur in NIH3T3[HB9] und nicht in NIH3T3[GFP] detektiert werden.

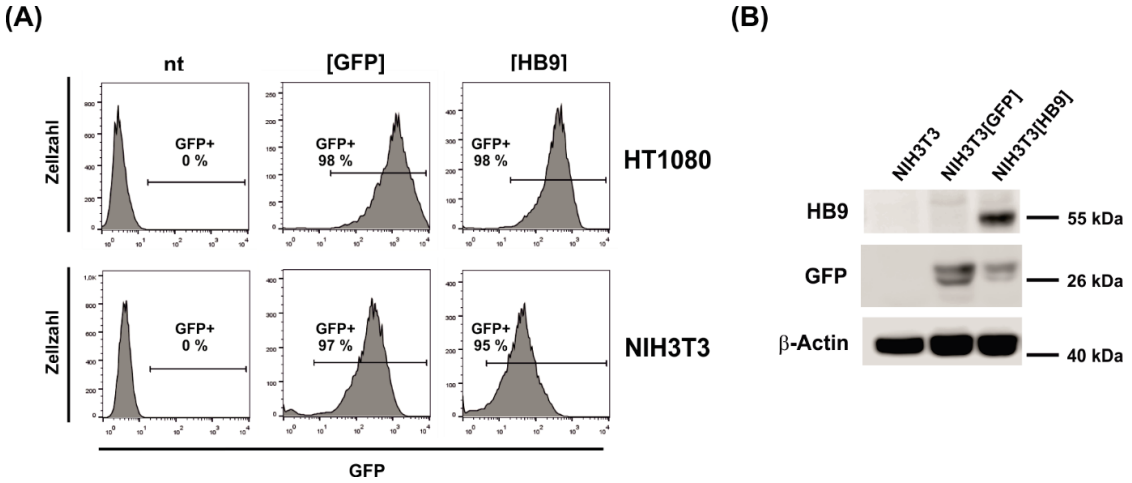

Abb. 14: Funktionsnachweis der lentiviralen Konstrukte in HT1080 und NIH3T3. (A) Nachweis der Funktionalität der Konstrukte in humanen HT1080 und murinen NIH3T3 Zellen. Beide Zelllinien wurden mit einem MOI von 7 mit [HB9] oder [GFP] transduziert und nach 72 h auf die Expression von GFP mittels FACS analysiert. **(B)** Westernblot-Analyse zum Nachweis von HB9 in NIH3T3[HB9].

24 h nach Transduktion wurden die Zellen für Proliferationsanalysen ausgesät und nachfolgend täglich Triplikate ausgezählt. Während die Leervektor transduzierten Zellen ein normales exponentielles Wachstum zeigten, arretierten die HB9 transduzierten Zellen 72 h nach Transduktion (Abb. 15).

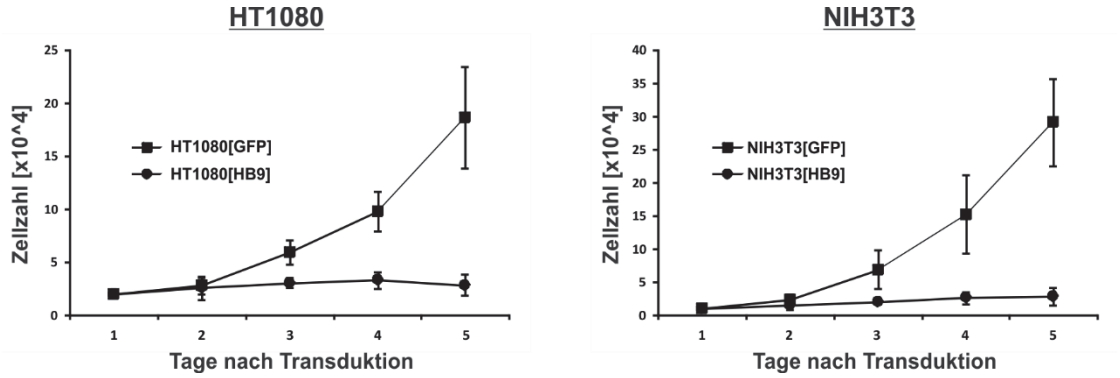

Abb. 15: Proliferationsanalyse HB9 transduzierter HT1080 und NIH3T3 Zellen. Proliferationsanalyse der mit HB9 [HB9] oder dem Leervektor [GFP] transduzierten HT1080 beziehungsweise NIH3T3 Zellen. 24 h nach Transduktion wurden die Zellen für die Proliferationsanalyse eingesät und täglich Triplikate ausgezählt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Zellzyklusanalysen wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Proliferationsarrest der HB9 transduzierten Zellen mit einem Arrest in einer bestimmten Phase des Zellzyklus einhergeht. Zellen wurden hierfür 72 h nach Transduktion geerntet, die DNA mittels Propidiumiodid angefärbt und per FACS analysiert (vgl. 3.3.12.2). Propidiumiodid bindet die DNA stöchiometrisch, so dass das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zu der Menge an DNA ist und die einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2/M-Phase, > 4n) unterschieden werden können. Apoptotische Zellen erscheinen aufgrund fragmentierter Zellkerne und einhergehender geringerer DNA-Menge als subG1 Peak (Abb. 16A).

HT1080[HB9] zeigten einen signifikanten Rückgang der S-Phase, wodurch die Zellen in der G1- und der G2/M-Phase des Zellzyklus arretierten, einhergehend mit einem Anstieg an apoptotischen Zellen in Form des subG1 Peaks, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 16B). Die Expression von HB9 in NIH3T3 führte ebenfalls zu einem signifikanten Rückgang der S-Phase, sowie zu einem signifikanten Rückgang von Zellen in der G1-Phase, während der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase gleich blieb. Interessanterweise akkumulierten bei NIH3T3[HB9] Zellen mit einem erhöhten Chromosomensatz (>4n). Analog zu HT1080 stieg der Anteil apoptotischer Zellen an (Abb. 16C).

Neben dem Proliferationsarrest konnte bei HT1080[HB9], sowie NIH3T3[HB9] Veränderungen der Zell-Morphologie beobachtet werden, die nachfolgend untersucht wurden.

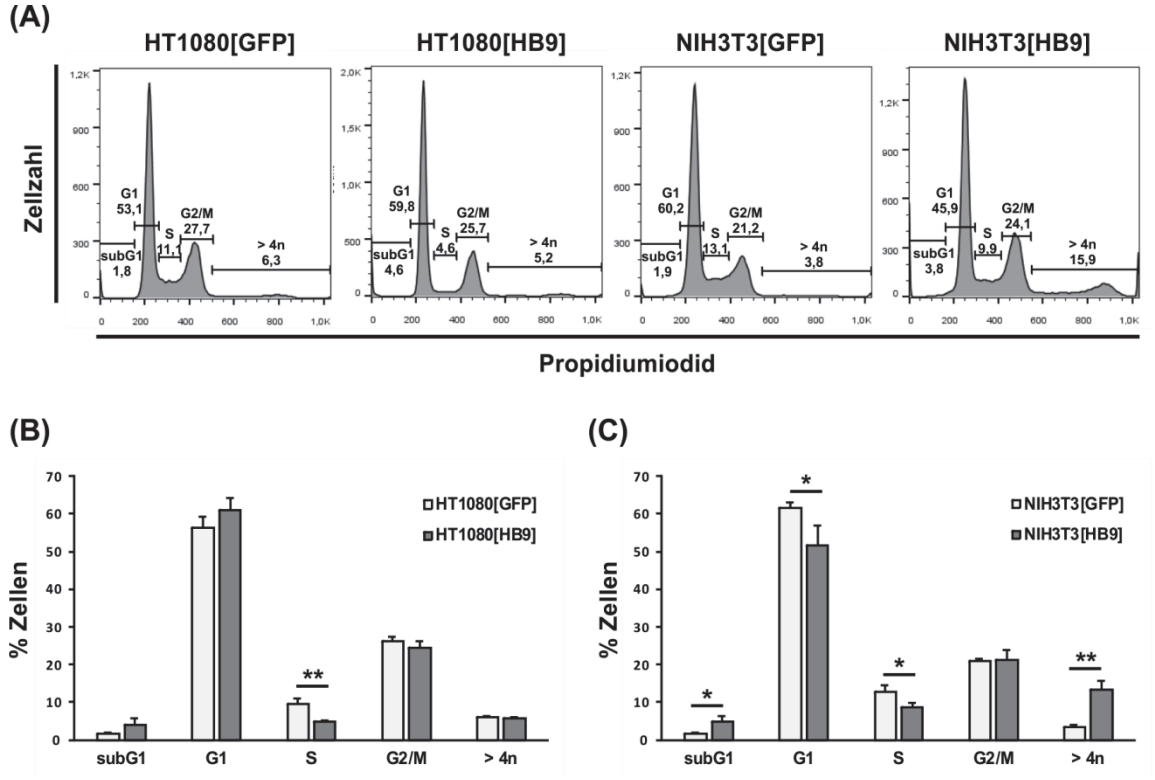

Abb. 16: Analyse zum Einfluss von HB9 auf den Zellzyklus. (A) FACS-Analyse zur Untersuchung des Zellzyklus in [HB9] beziehungsweise [GFP] transduzierten HT1080 und NIH3T3. Die DNA wurde mittels Propidiumiodid angefärbt und die Zellzyklusphasen entsprechend der DNA-Menge unterteilt in subG1, G1, S, G2/M und > 4n. Auswertung der FACS-Analyse des Zellzyklus in HT1080[HB9] verglichen zu HT1080[GFP] **(B)** und in NIH3T3[HB9] verglichen zu NIH3T3[GFP] **(C).** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen, die sich in der jeweiligen Phase des Zellzyklus befinden (n=3). Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0,05$) beziehungsweise mit **($p \leq 0,01$).

4.2.2 Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie

Die Expression von HB9 führte sowohl in HT1080 als auch in NIH3T3 zu einer Vergrößerung des Zellumfangs, bei gleichzeitiger Abflachung der Zellen (Abb. 17A). Zudem wurde eine signifikante Zunahme an mehrkernigen Zellen beobachtet. HT1080[HB9] wiesen eine 8 fache und NIH3T3[HB9] eine 11 fache Zunahme an mehrkernigen Zellen verglichen zu den Leervektor-Kontrollen auf (Abb. 17B).

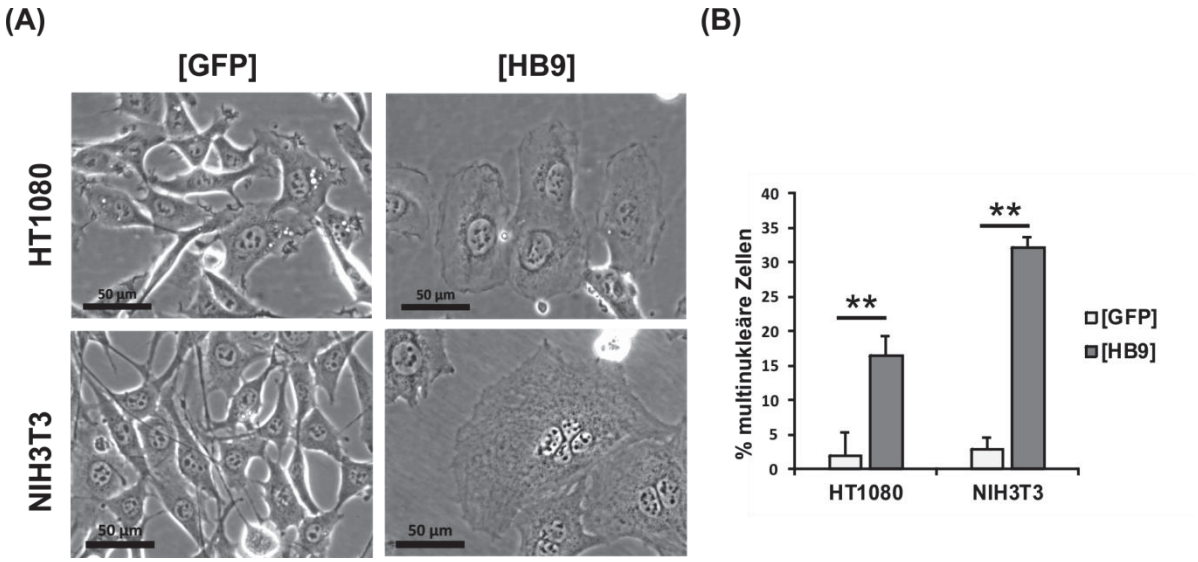

Abb. 17: Untersuchung zum Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von HT1080 und NIH3T3 transduziert mit [HB9] beziehungsweise [GFP], aufgenommen 72 h nach Transduktion. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm. **(B)** Der Anteil multinukleärer Zellen in den mit [HB9] beziehungsweise [GFP] transduzierten HT1080/NIH3T3 wurde sieben Tage nach Transduktion lichtmikroskopisch bestimmt. Es wurden jeweils 150 Zellen ausgezählt und der Anteil multinukleärer Zellen bestimmt (n=3). Signifikante Unterschiede sind markiert mit **($p \leq 0{,}01$).

In der Literatur werden derartige morphologische Veränderungen der Zelle mit der Entstehung von Seneszenz in Zusammenhang gebracht. Die Induktion von Seneszenz wird als Schutzmechanismus angesehen, um die Proliferation von Zellen zu unterbinden, die aufgrund von Telomerverkürzung einen irreversiblen DNA-Schaden akkumuliert haben [142, 143]. Tritt die Seneszenz vor Erreichen des zellulären Replikationslimits ein, spricht man von prämaturer Seneszenz [142, 143]. Diese kann durch genotoxischen oder replikativen Stress ausgelöst werden. Um zu untersuchen, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen Seneszenz-assoziiert sind, wurde eine Seneszenz-spezifische β-Galaktosidase Färbung durchgeführt [144]. Hierbei wird die Aktivität von β-Galaktosidase (β-Gal) bei einem pH-Wert von 6,0 nachgewiesen, die spezifisch für seneszente Zellen ist. Der Nachweis erfolgt histochemisch über die Umsetzung des Substrates X-Gal, welche in einem blauen Niederschlag resultiert. HB9

transduzierte Zellen wiesen eine deutliche β-Gal-Aktivität auf, während die Leervektor transduzierten Zellen kaum (0-4 % der Zellen) positiv waren (Abb. 18A). Verglichen zum Leervektor nahm die Anzahl β-Gal$^+$ Zellen bei HT1080[HB9] 10 fach und bei NIH3T3[HB9] 133 fach zu (Abb. 18B).

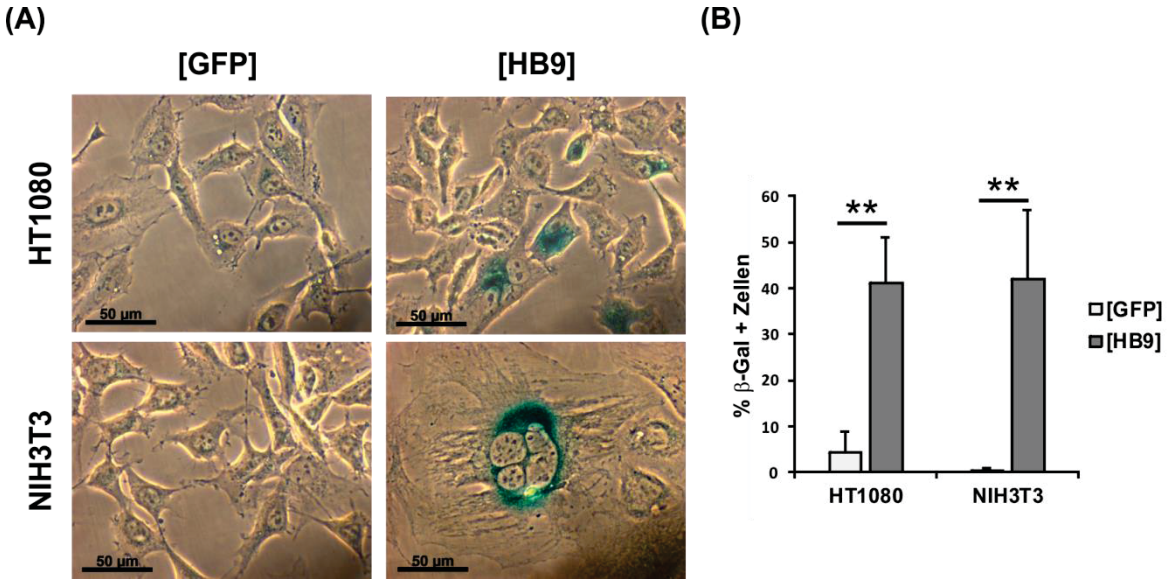

Abb. 18: Seneszenz-spezifische β-Galaktosidase Färbung. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von HT1080 und NIH3T3 Zellen, transduziert mit [HB9] beziehungsweise [GFP]. Sechs Tage nach Transduktion wurde die Seneszenz-assoziierte β-Gal Aktivität bei pH 6,0 mittels Niederschlagsfärbung nachgewiesen. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm. **(B)** Es wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt und der Anteil β-Gal$^+$ Zellen bestimmt (n=3). Signifikante Unterschiede sind markiert mit **($p \leq 0{,}01$).

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten weitere Seneszenz-assoziierte Veränderungen des Zytoskeletts. So wiesen HT1080[HB9] und NIH3T3[HB9] verglichen zum Leervektor deutlich mehr Aktin auf, welches in Stress-Fibern organisiert war [145] (Abb. 19). Stress-Fibern bestehen aus einem Bündel von Aktin-Filamenten, die in „*Focal Adhesions*“, den Bindegliedern zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett, verankert sind, und treten in Folge von mechanischem Stress auf [146]. Zusätzlich konnte bei HT1080[HB9] eine nukleäre Akkumulation von Aktin beobachtet werden, die ebenfalls Seneszenz-assoziiert auftritt [147-149]. HB9 zeigte in beiden Zelllinien eine nukleäre Lokalisation, welche der Funktion als Transkriptionsfaktor entspricht.

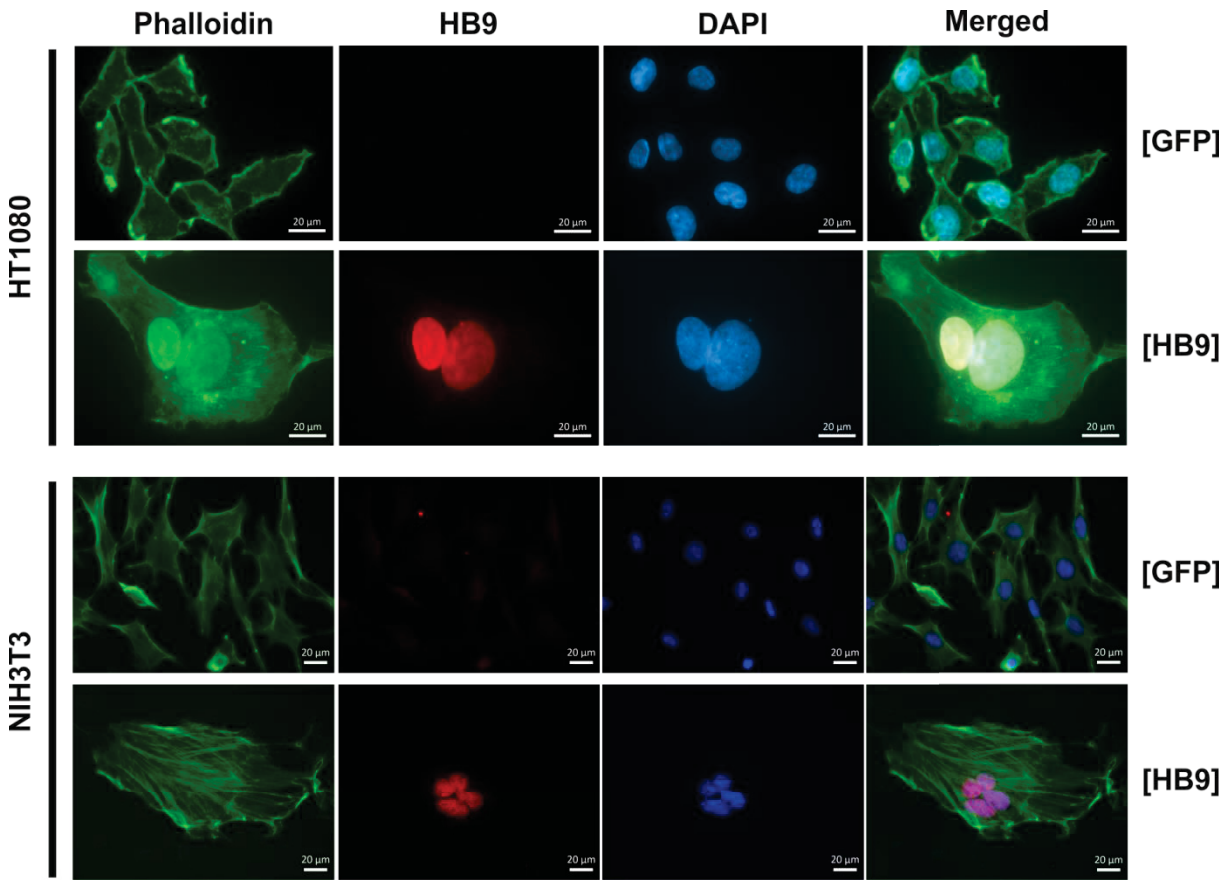

Abb. 19: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Einfluss von HB9 auf die zelluläre Morphologie. Sechs Tage nach Transduktion mit [HB9] beziehungsweise [GFP] wurden HT1080 und NIH3T3 Zellen fixiert und mit HB9-Antikörper (AF 594), Phalloidin-AF 660 (zum Nachweis von Aktin; dargestellt in grün) und DAPI (zum Nachweis der DNA) inkubiert. Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle, sowie eine Überlagerung (Merged). Der Maßstabsbalken beträgt 20 µm.

4.2.3 Einfluss von HB9 auf den p53/p21-Signalweg

P53 fungiert als Tumor-Suppressor und ist ein bedeutender Mediator bei der Induktion zellulärer Seneszenz [143]. Unter Stressbedingungen, beispielsweise im Falle einer DNA-Schädigung, wird p53 von Kinasen sequenzspezifisch phosphoryliert und so vor proteasomaler Degradation geschützt [150]. Infolgedessen akkumuliert p53 und aktiviert nachgeschaltete Signalwege, die den Zellzyklus arretieren, um den DNA-Schaden zu beheben. Ist der DNA-Schaden irreversibel, wird entweder Apoptose oder Seneszenz eingeleitet, abhängig von der Art des DNA-Schadens, dem Zelltyp, sowie Intensität und Dauer der *DNA-Damage Response* [143, 151]. Um zu untersuchen, ob der HB9 induzierte Proliferationsarrest über den p53 Signalweg vermittelt wird, wurden Westernblot Analysen durchgeführt.

HT1080[HB9] zeigten eine Akkumulation an p53, ebenso wie ein deutliches Signal für die Phosphorylierung an Serin 15, welche indikativ für die Aktivierung von p53 in Folge eines

DNA-Schadens ist [150] (Abb. 20A). Als Kontrolle wurden Lysate mit Gammastrahlen (γ-IR) behandelter Zellen aufgetragen. Als nachgeschalteter Effektor von p53 wurde p21 analysiert, welches über Interaktion mit verschiedenen Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen zum Zellzyklusarrest führt [152, 153]. Für die Induktion von Seneszenz ist ein anhaltendes p21 Signal maßgeblich. HT1080[HB9] zeigten eine deutliche Induktion von p21, die Ursache der Seneszenz Induktion sein könnte.

Die Aktivierung des p53-Signalweges durch HB9 konnte in NIH3T3 bestätigt werden (Abb. 20B). Als Kontrolle wurden die im Vergleich zu HT1080 Bestrahlungs-resistenteren NIH3T3 Zellen mit dem Zytostatikum Etoposid behandelt, welches durch Hemmung der Topoisomerase II DNA schädigend wirkt [154].

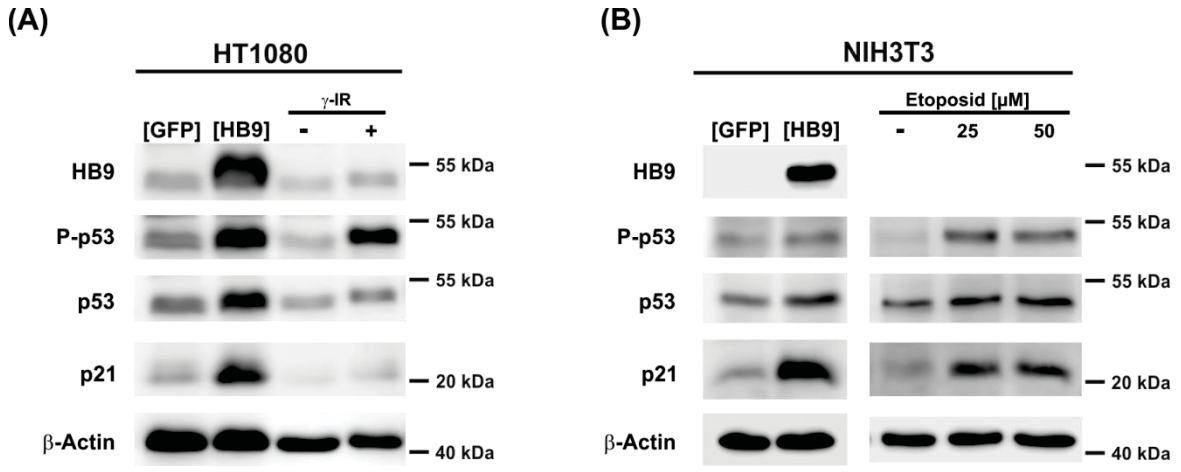

Abb. 20: Westernblot-Analyse zum Einfluss von HB9 auf die Aktivierung des p53/p21 Signalweges. HT1080 **(A)** und NIH3T3 **(B)** wurden mit [HB9] beziehungsweise [GFP] transduziert und 72 h nach Transduktion für die Proteinanalyse geerntet. Analysiert wurde die Phosphorylierung von p53 an Ser15 (P-p53), die Gesamtmenge an p53, sowie die Aktivierung des *Downstream*-Mediators p21. Als Kontrolle für die Signalwegaktivierung wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (γ-IR) oder mit dem Zytostatikum Etoposid unter den angegebenen Konzentrationen über Nacht inkubiert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Exemplarische Darstellung für n=3.

Unter siRNA vermitteltem *Knockdown* von P53 wurden die Proliferations- und Zellzyklusexperimente wiederholt, um zu untersuchen, ob der HB9 induzierte Proliferationsarrest über p53 gesteuert wird. Dies wurde exemplarisch an HT1080 Zellen durchgeführt. Zur Überprüfung der Effizienz und des Zeitfensters des p53 *Knockdowns* durch die siRNA, wurden HT1080 Zellen mit gegen p53 gerichteter (p53) oder ungerichteter (nt) siRNA transfiziert und die p53 Proteinmenge über einen Zeitraum von 120 h beobachtet (Abb. 21). Der Westernblot zeigte eine hohe Effizienz des p53 *Knockdowns* bis zu 48 h nach Transfektion, wodurch die Effektivität der verwendeten siRNA bestätigt wurde. Bedingt durch die transiente Wirkung der siRNA ließ der *Knockdown* 72 h nach Transfektion nach.

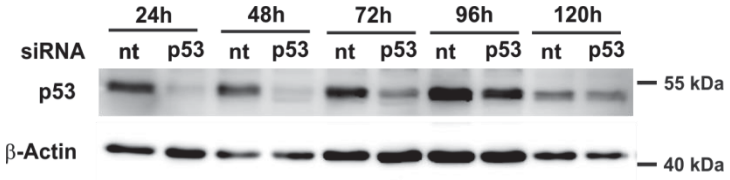

Abb. 21: Westernblot Analyse zum Nachweis des siRNA vermittelten *Knockdowns* von p53. HT1080 Zellen wurden mit ungerichteter (nt) oder gegen p53 gerichteter siRNA (p53) transfiziert und die Zellen nach 24/48/72/96/120 h geerntet und auf die Proteinexpression von p53 analysiert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Für die Proliferationsanalyse wurden die Zellen 8 h vor (HB9)-GFP-Transduktion mit p53 oder ungerichteter siRNA transfiziert und 24 h später ausgesät. HT1080[GFP] transfiziert mit ungerichteter siRNA dienten als Kontrolle. HT1080[HB9], transfiziert mit p53 siRNA, zeigten zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zu HT1080[HB9], transfiziert mit ungerichteter siRNA (Abb. 22A). Innerhalb von 72 h manifestierte sich bei HT1080[HB9], transfiziert mit ungerichteter siRNA, ein Proliferationsarrest, während unter p53 *Knockdown* eine stetige Proliferation von HT1080[HB9] zu beobachten war. Die Proliferation von HT1080[HB9], transfiziert mit p53 siRNA, nahm jedoch verglichen zu HT1080[GFP] mit der Zeit ab, was sich auf die zeitlich bedingte Abnahme an p53 siRNA in der Zelle zurückführen lässt (vgl. Abb. 21).
Analog zu den Ergebnissen der Proliferationsstudie, zeigte die Analyse des Zellzyklus keinen signifikanten Unterschied von HT1080[HB9], transfiziert mit p53 siRNA, verglichen zu HT1080[GFP], transfiziert mit ungerichteter siRNA, während die mit ungerichteter siRNA transfizierten HT1080[HB9] einen Einbruch der S- und einen Anstieg der G1-Phase zeigten (Abb. 22B).
Die Westernblot-Analyse zeigte, dass in HT1080[HB9] durch den siRNA vermittelten *Knockdown* das p53 *Signaling* im Vergleich zu HT1080[HB9], transfiziert mit ungerichteter siRNA, deutlich reduziert war (Abb. 22C).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der HB9-induzierte Proliferationsarrest über Aktivierung des p53/p21-Signalwegs vermittelt wird. Der Nachweis der Phosphorylierung von p53 an Serin 15 indiziert die Akkumulation von p53 in Folge von *DNA-Damage Response* [150].
Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass die Expression von HB9 zu DNA-Schäden führt, wodurch die beobachtete prämature Seneszenz induziert wurde. Das Auslösen von Seneszenz

als Tumor-suppressivem Mechanismus geschieht nur in Folge onkogener Stimuli [155] und ist ein eindeutiger Hinweis auf das onkogene Potential von HB9.

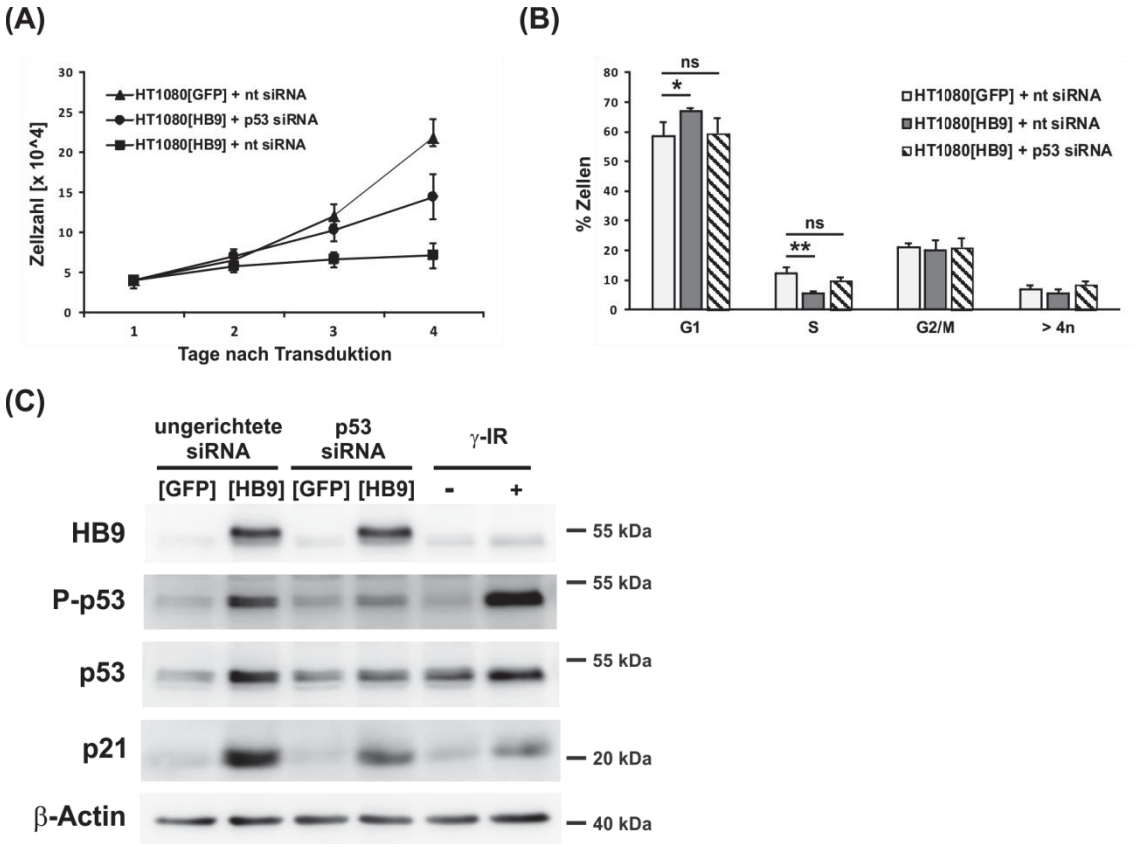

Abb. 22: Untersuchungen zum Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus unter p53 *Knockdown*. Für die Proliferationsanalyse wurden HT1080 Zellen mit ungerichteter beziehungsweise mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert und mit [HB9] transduziert. **(A)** Einen Tag nach Transfektion/Transduktion wurden die Zellen ausgesät und täglich in Triplikaten ausgezählt. HT1080[GFP] transfiziert mit ungerichteter siRNA dienten als Kontrolle (n=3). **(B)** 72 h nach Transfektion/Transduktion wurde die Zellzyklusverteilung bestimmt (n=3). Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0,05$) beziehungsweise mit **($p \leq 0,01$). ns = nicht signifikant. **(C)** Westernblotanalyse des p53/p21-Signalweges. Analysiert wurde die Phosphorylierung von p53 an Ser15 (P-p53), die Gesamtmenge an p53, sowie die Aktivierung des *Downstream*-Mediators p21. Als Kontrolle für die Signalwegaktivierung wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (γ-IR). Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

4.3 Untersuchung zum Einfluss von HB9 auf die Hämatopoese *in vivo*

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass HB9 das Genexpressionsprofil primärer HSPZ beeinflusst und *in vitro* prämature Seneszenz induzieren kann. Prämature Seneszenz in Folge von Onkogen Expression wie beispielsweise RAS^{V12} oder $BRAF^{E600}$ wird „Onkogen-induzierte Seneszenz“ genannt [156]. Während die Expression dieser Onkogene *in vitro* zu Seneszenz führt, kommt es *in vivo* zur Ausbildung prämaligner Neoplasien [157].

Um zu untersuchen, ob das durch HB9 veränderte Genexpressionsprofil von HSPZ die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflusst und die *in vitro* beobachtete Seneszenz *in vivo* zur Entstehung einer Neoplasie führt, wurde ein murines Transplantationsmodell verwendet. HSPZ wurden aus Spendertieren isoliert, *in vitro* lentiviral mit HB9 oder dem Leervektor transduziert, und in myeloablativ bestrahlte Empfängertiere transplantiert. Die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems im Empfängertier wurde über serielle Blutabnahmen und FACS-Analyse verfolgt.

Zur Anreicherung von HSPZ aus dem Knochenmark der Spendertiere wurden alle Zellen, die bereits Differenzierungs-Marker tragen (*Lineage*$^+$/Lin$^+$), mittels magnetischer Zellseparation depletiert (Abb. 23).

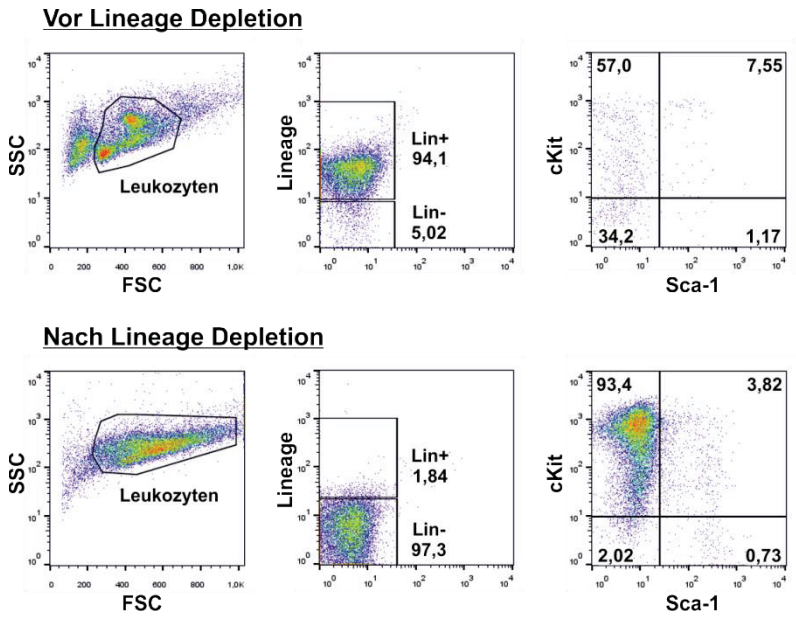

Abb. 23: *Lineage* Depletion zur Anreicherung von HSPZ aus murinem Knochenmark. Knochenmark wurde aus Femur und Tibia von C57BL/6 Mäusen isoliert und Zellen, die bereits Differenzierungs-Marker (*Lineage*) tragen, immunmagnetisch (MACS) depletiert. Die angereicherten HSPZ wurden mittels FACS auf die Abwesenheit von *Lineage*-Markern, sowie die Expression von Stammzell-Markern wie c-Kit und Sca-1 analysiert.

Die Effektivität der Depletion Lin^+ Zellen lag bei über 95 %. Die resultierenden Lin^- Zellen waren zu über 95 % positiv für den Stammzellmarker c-Kit. Neben c-Kit wurde der Stammzellmarker Sca-1 in die Analyse einbezogen. Innerhalb der Lin^- Vorläuferzellen stellen die c-Kit/Sca-1 doppelpositiven LSK-Zellen den Stammzellpool dar. Aus dem Knochenmark einer Maus konnten im Durschnitt $1{,}5*10^5$ Lin^- Zellen isoliert werden.

Die Lin^- Vorläuferzellen wurden mit einem MOI von 50 transduziert und die Transduktionsrate anhand der GFP-Expression bestimmt. Bei den Leervektor transduzierten Lin^- Zellen (Lin[GFP]) lag die Transduktionseffizienz bei 10-20 % und bei den mit HB9 transduzierten Lin^- Zellen (Lin[HB9]) bei 7-15 % (Abb. 24A). Die Verwendung höherer MOIs zur Steigerung der Transduktionsrate erwies sich als ineffizient, da die Viabilität der Zellpopulation deutlich zurückging. qRT-PCR Analysen zeigten, dass trotz vergleichbarer Frequenzen an GFP^+ Zellen in der FACS-Analyse höhere GFP-Transkriptmengen in Lin[HB9] detektiert werden konnten (Abb. 24B).

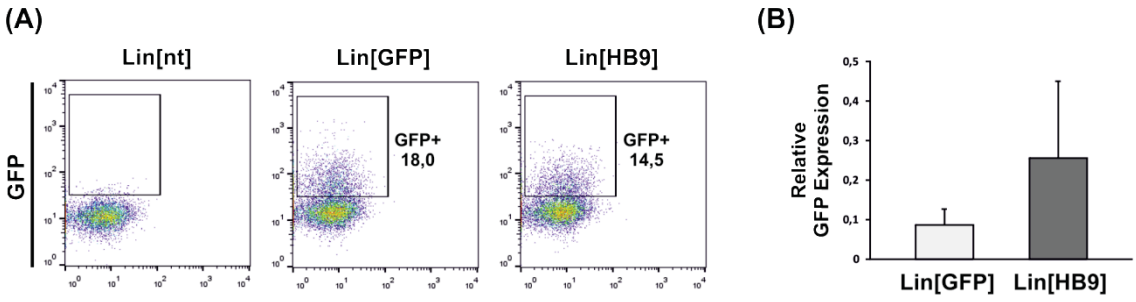

Abb. 24: Transduktion muriner Lin^- HSPZ. Murine Lin^- HSPZ wurden 24 h nach Isolation mit [GFP] (Lin[GFP]) beziehungsweise [HB9] (Lin[HB9]) transduziert und drei Tage später auf **(A)** die Expression von GFP im FACS analysiert. **(B)** qRT-PCR Analyse zur Bestimmung der GFP-Expression in Lin[GFP] und Lin[HB9] relativ zu β-Aktin (n=3).

HB9 Transkripte konnten nur in Lin[HB9], nicht aber in Lin[GFP] oder in nicht sortierten Knochenmarkszellen nachgewiesen werden (Abb. 25). Als Positivkontrolle wurde murines Gehirn verwendet, ein Gewebe in dem HB9 physiologisch exprimiert wird. Da der Nachweis des transgenen HB9 auf Proteinebene bereits in der murinen Zelllinie NIH3T3 gezeigt werden konnte, wurde hier aufgrund der geringen Zellmengen darauf verzichtet.

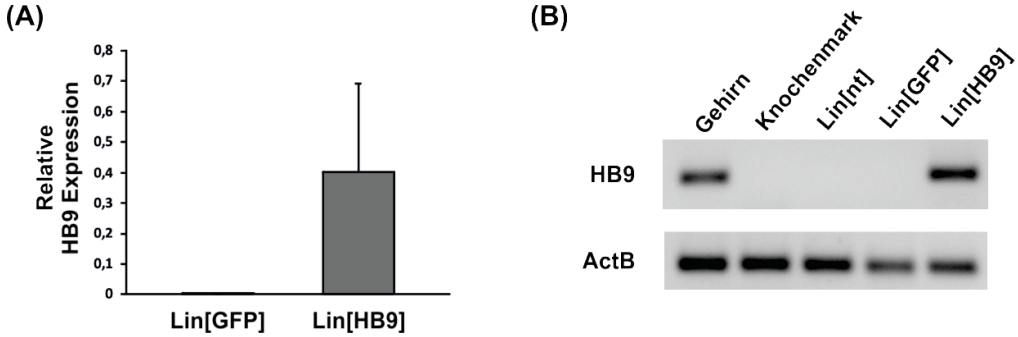

Abb. 25: Nachweis der HB9-Expression in Lin[HB9]. (A) qRT-PCR Analyse zur Expression von HB9 in Lin[GFP] und Lin[HB9] relativ zu β-Aktin (n=3). **(B)** Gesamtknochenmark von C57BL/6 Mäusen, sowie [GFP], [HB9] und nicht transduzierte [nt] Lin$^-$ Zellen wurden auf die Expression von HB9 untersucht. Als Positivkontrolle wurde Gehirngewebe verwendet. β-Aktin (ActB) diente als Ladekontrolle.

Für die Transplantation wurden Empfängertiere myeloablativ bestrahlt und nach 24 h Lin[GFP] beziehungsweise Lin[HB9] Zellen über die Schwanzvene injiziert. Zwölf Wochen nach Transplantation wurde den Empfängertieren erstmalig Blut abgenommen und anhand von FACS-Analysen die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems durch die transplantierten Zellen überprüft. Zur Unterscheidung von transplantierten und körpereigenen hämatopoetischen Zellen diente der Pan-Leukozyten-Marker CD45. Von diesem Marker existieren zwei verschiedene Allel-Varianten, CD45.1 und CD45.2, in denen sich die Mausstämme unterscheiden. Während der Mausstamm der Empfängertiere CD45.1 exprimiert, ist der Mausstamm der Spendertiere positiv für das CD45.2 Allel, so dass alle Zellen die von den transplantierten Zellen abstammen CD45.2 positiv sind.

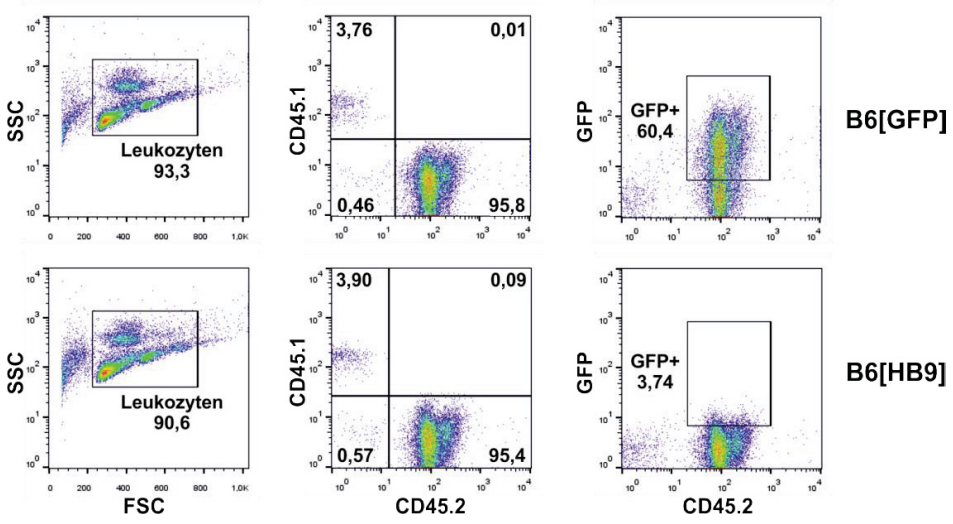

Abb. 26: Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution in B6[GFP] und B6[HB9]. Zwölf Wochen nach Transplantation wurden den mit Lin[GFP] beziehungsweise Lin[HB9] transplantierten Mäusen (B6[GFP] beziehungsweise B6[HB9]) Blut abgenommen und im FACS auf die Expression der Oberflächenmarker CD45.1 und CD45.2, sowie auf GFP-Expression untersucht. CD45.1 markiert körpereigene hämatopoetische Zellen des Empfängertieres, während alle hämatopoetischen Zellen, die von den transplantierten Lin$^-$Zellen abstammen, CD45.2$^+$ sind.

Sowohl die Blutzellen der mit Lin[GFP] transplantierten Mäuse (B6[GFP]), als auch die Blutzellen der Lin[HB9] transplantierten Mäuse (B6[HB9]) waren 12 Wochen nach Transplantation zu über 95 % CD45.2 positiv, wodurch eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems durch die transplantierten CD45.2$^+$ Lin- Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 26). Während die Blutzellen der B6[GFP] Mäuse je nach Tier zu 25-70 % GFP$^+$ waren, konnte bei den B6[HB9] Mäusen nur ein sehr geringer Anteil an GFP$^+$ Zellen (1-5 %) detektiert werden (Abb. 26).

Durch die Analyse weiterer Oberflächenmarker mittels FACS wurden die Blutzellen differenziert in T-Zellen (CD3$^+$), B-Zellen (CD19$^+$), Monozyten (CD11b$^+$/Gr-1$^-$) und Granulozyten (CD11b$^+$/Gr-1$^+$). Sowohl in den B6[GFP] als auch in den B6[HB9] Mäusen konnte jeder untersuchte Zelltyp innerhalb der CD45.2$^+$ Zellpopulation nachgewiesen werden, wodurch die erfolgreiche Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bestätigt wurde (Abb. 27). In den B6[GFP] Mäusen konnte die GFP-Expression in jeder Zellreihe nachgewiesen werden, während in den B6[HB9] Mäusen unabhängig von der Zellreihe nur ein sehr geringer Anteil GFP$^+$ Zellen beobachtet wurde (Abb. 27).

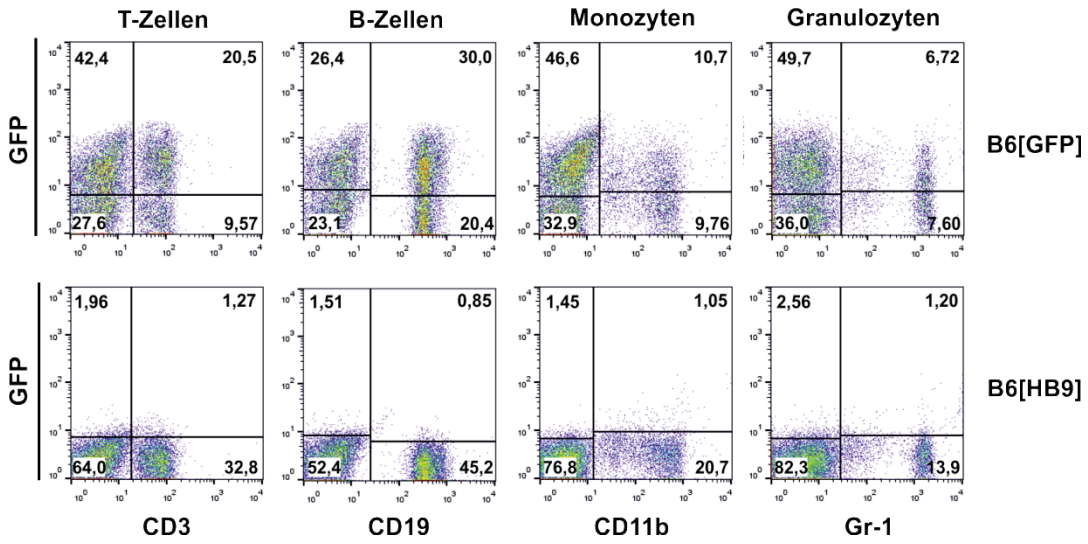

Abb. 27: GFP-Nachweis im peripheren Blut von B6[GFP] und B6[HB9] Mäusen. FACS Analyse der GFP-Expression in CD45.2$^+$ T-Zellen (CD3$^+$), B-Zellen (CD19$^+$), Monozyten (CD11b$^+$, Gr-1$^-$) und Granulozyten (CD11b$^+$, Gr-1$^+$).

Die genomische Integration der Expressionskassetten wurde mittels HB9 oder Leervektor spezifischer PCR nachgewiesen (Abb. 28A), und bestätigte, dass auch in den B6[HB9] Mäusen transduzierte Stammzellen angewachsen waren. Zum Nachweis der Transgen-Expression wurde eine Multiplex qRT-PCR auf GFP und β-Aktin (ActB) durchgeführt. Da es sich bei dem HB9-Expressionsvektor um ein bicistonisches System handelt, bei dem die Sequenzen für HB9

und GFP auf einem Transkript liegen, stimmt die GFP- mit der HB9-Expression überein. Ebenso wie die stabile Integration in die genomische DNA, konnte auch die Expression des HB9-GFP Konstruktes in den B6[HB9] Mäusen auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Abb. 28B). Als Negativkontrolle für die GFP-PCR wurde Blut nicht transplantierter Mäuse verwendet. –RT Ansätze wurden durchgeführt, um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. Der Nachweis der Integration und Expression der Konstrukte wurde für jedes Tier durchgeführt. Die qRT-PCR Analyse zeigte, dass die GFP-Expression in B6[HB9] im Vergleich zu B6[GFP] deutlich reduziert war (Abb. 28C), und korreliert so mit dem Ergebnis der FACS-Analyse.

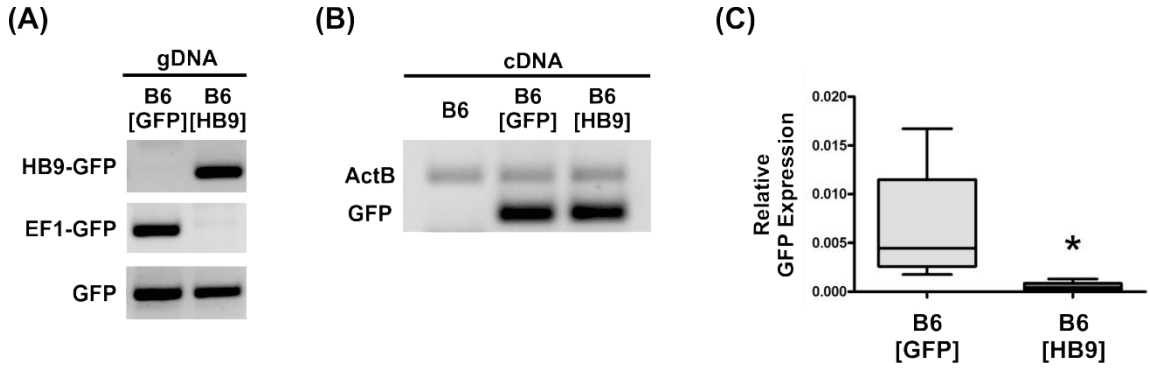

Abb. 28: Nachweis der genomischen Integration und Expression der Transgene im peripheren Blut von B6[GFP] und B6[HB9]. (A) PCR-Analyse zum Nachweis der genomischen Integration des Transgens. Es wurden spezifische PCR-Reaktionen für die HB9- (HB9-GFP) und die Leervektor- (EF1-GFP) Expressionskassette verwendet. Die Amplifikation von GFP diente als interne Kontrolle. **(B)** Expressionsnachweis der Transgene auf Transkriptebene und **(C)** Quantifizierung der GFP-Expression. ActB diente als Referenzgen (n=6). Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0{,}05$).

Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde den Tieren in seriellen Abständen Blut entnommen und auf die Expression von GFP sowie die Zellzusammensetzung untersucht. Innerhalb des Beobachtungszeitraums nahm der Anteil an T-Zellen in B6[HB9] verglichen zu B6[GFP] Mäusen ab (Abb. 29A) und konnte sowohl für $CD4^+$ als auch für $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 29B). Der Anteil an B-Zellen war nach sechs Monaten ebenfalls reduziert. Während die Frequenz lymphoider Zellen reduziert war, zeigten die B6[HB9] Mäuse eine gesteigerte Anzahl an Zellen der myeloiden Zellreihe. So konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg eine konstant gesteigerte Anzahl an Granulozyten, sowie im zeitlichen Verlauf eine Zunahme an Monozyten beobachtet werden (Abb. 29A).

Unabhängig von der Zellreihenzugehörigkeit wiesen die B6[HB9] Mäuse im Vergleich zu B6[GFP] Mäusen zu jedem Analysezeitpunkt eine reduzierte Zellkonzentration im Blut auf (Abb. 29C).

Die Frequenz GFP$^+$ Zellen im peripheren Blut der B6[GFP] und B6[HB9] Mäuse verhielt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg stabil (vgl. Abb. 27).

Die Tatsache, dass GFP$^+$ ausdifferenzierte Zellen auch noch sechs Monaten nach Transplantation nachweisbar waren, belegt die erfolgreiche Transduktion und Transplantation von LT-HSZ.

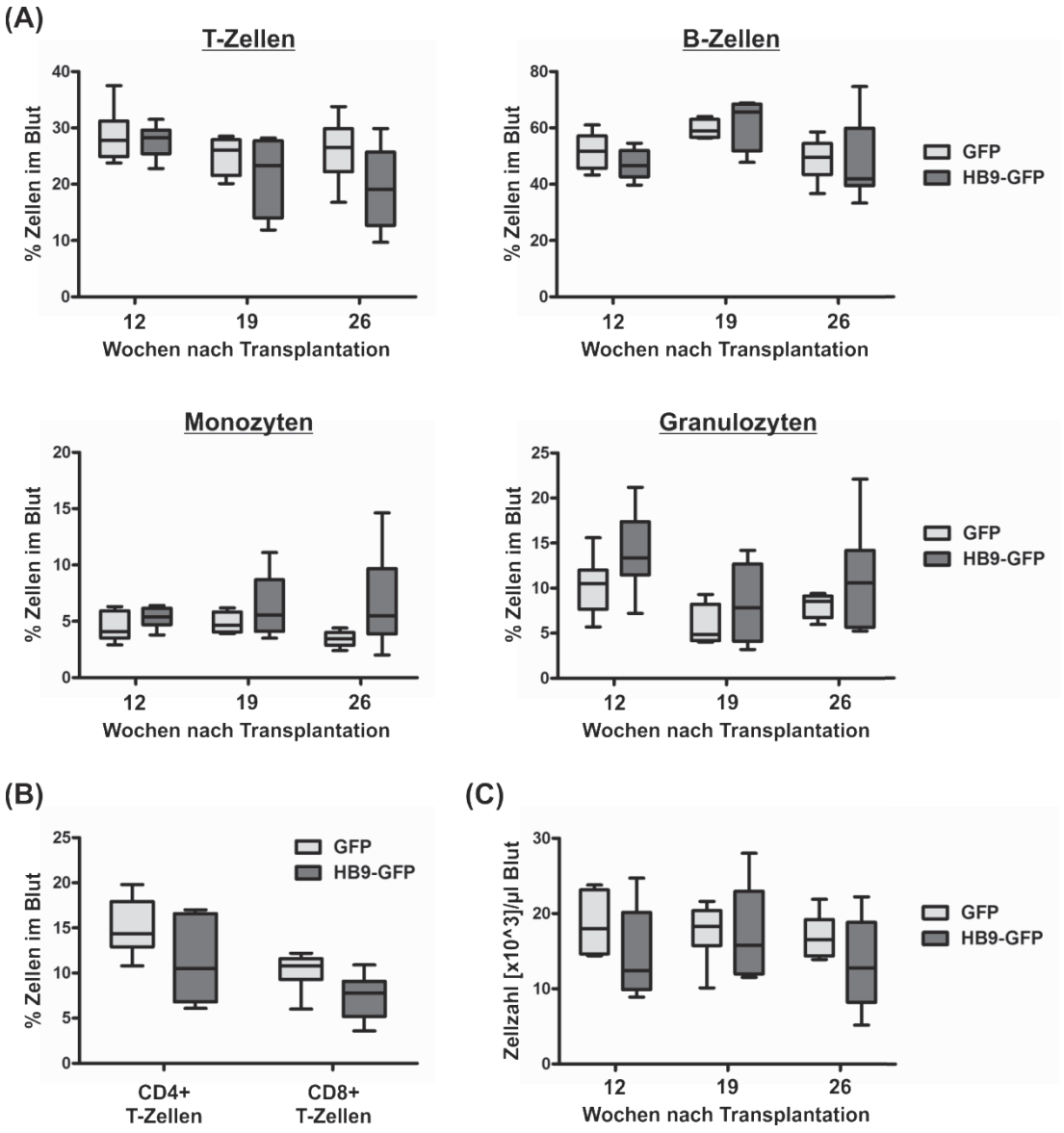

Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der zellulären Zusammensetzung des peripheren Blutes von B6[GFP] und B6[HB9]. (A) 12, 19 und 26 Wochen nach Transplantation wurde den B6[GFP] beziehungsweise B6[HB9] Mäusen Blut abgenommen und mittels FACS-Analyse der prozentuale Anteil an T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten bestimmt. **(B)** Anteil CD4+ und CD8+ T-Zellen 26 Wochen nach Transplantation. **(C)** Leukozytenzahl/µl Blut (n=6).

Sechs Monate nach Transplantation wurden die Tiere euthanasiert und weitere hämatopoetische Organe wie Milz, Thymus und Knochenmark analysiert. In B6[HB9] konnte im Vergleich zum Blut keine gesteigerte Frequenz an GFP^+ Zellen in den anderen hämatopoetischen Organen beobachtet werden (Abb. 30).

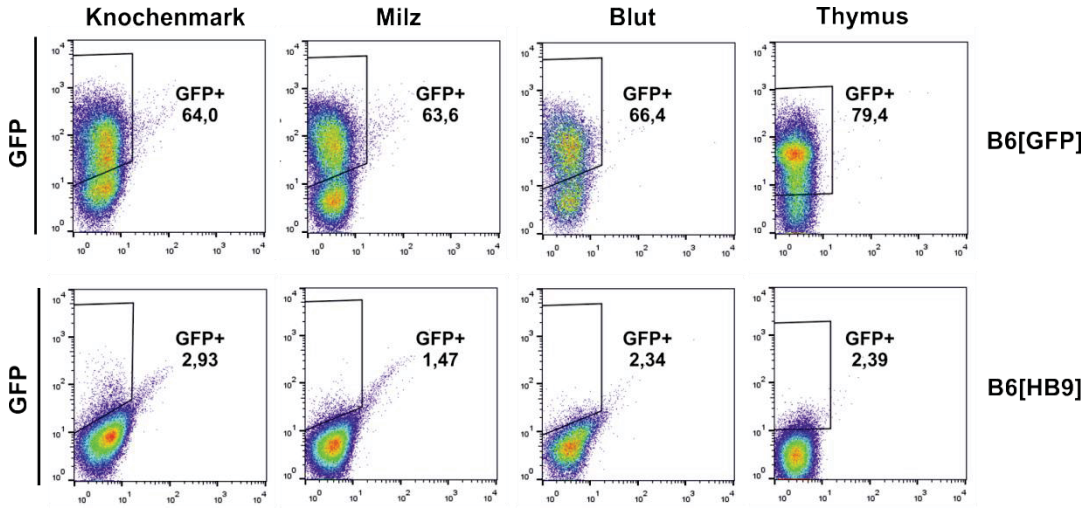

Abb. 30: FACS-Analyse der GFP-Expression in hämatopoetischen Organen von B6[GFP] und B6[HB9]. Sechs Monate nach Transplantation wurden die B6[GFP] und B6[HB9] Mäuse euthanasiert und hämatopoetische Organe wie Knochenmark, Milz, Blut und Thymus mittels FACS-Analyse auf die Expression von GFP untersucht.

Im Folgenden wurde die zelluläre Zusammensetzung der genannten hämatopoetischen Organe untersucht. Ebenso wie im Blut, konnte auch in Milz und Knochenmark eine Reduktion an ausdifferenzierten lymphoiden B- und T-Zellen bei B6[HB9] nachgewiesen werden (Abb. 31A, B). Im Gegensatz dazu konnte keine Reduktion an T-Zell-Vorläufern (CD4/CD8 doppelpositiv; DP) im Thymus und sogar ein deutlicher Anstieg an B-Zell-Vorläufern ($CD93^+$; Median: B6[GFP]: 2,4 % vs B6[HB9]: 4,1 %, p=0,17) im Knochenmark beobachtet werden.
Ein Anstieg myeloider Monozyten/Makrophagen, welcher bereits im Blut beobachtet worden war, konnte in Milz und Knochenmark bestätigt werden (Abb. 31C). Die gesteigerte Anzahl an Granulozyten beschränkte sich jedoch auf das Blut und konnte in den anderen Organen nicht detektiert werden (Abb. 31D).

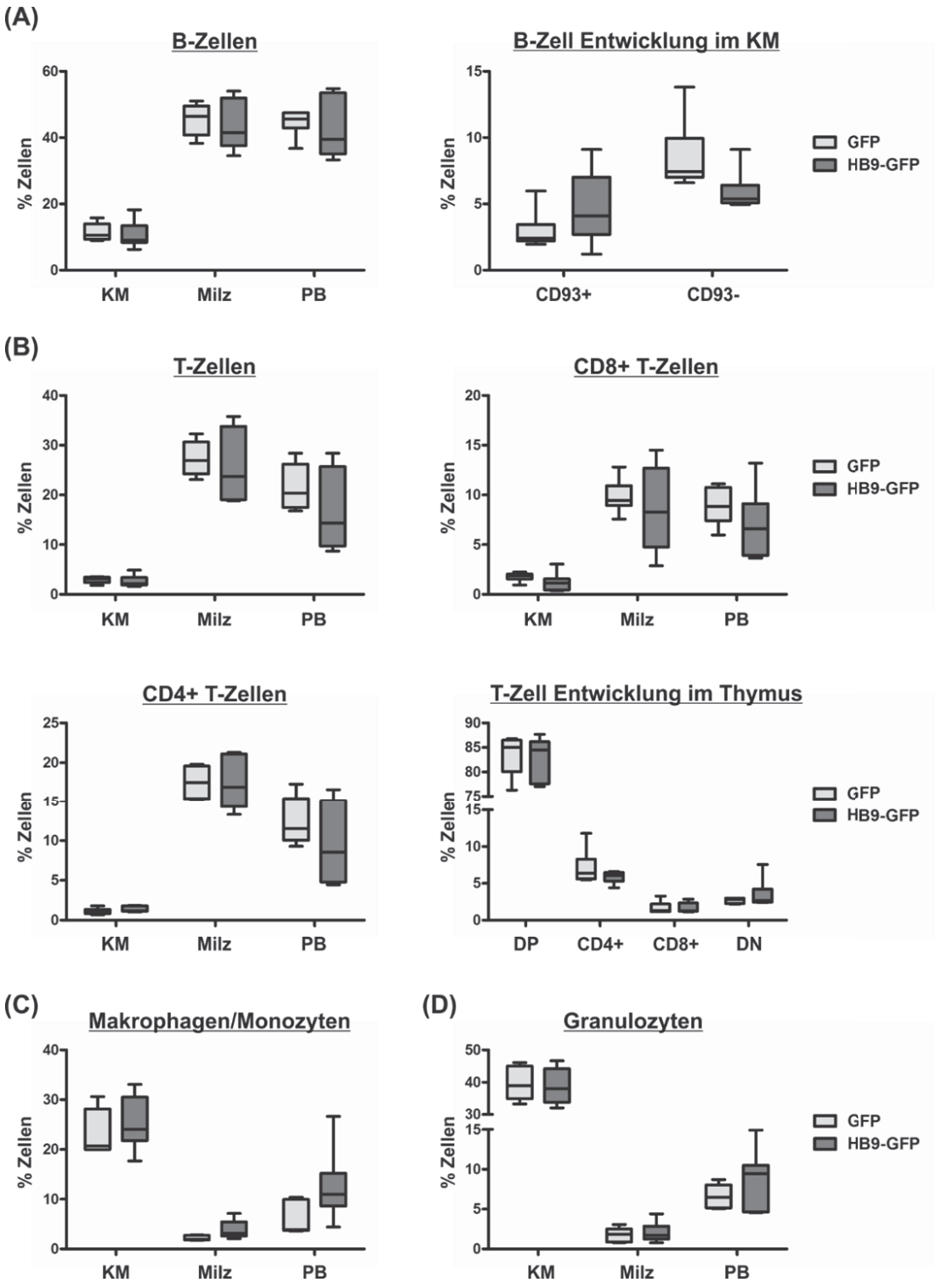

Abb. 31: Untersuchung zur zellulären Zusammensetzung hämatopoetischer Organe von B6[GFP] und B6[HB9]. Durch FACS-Analyse wurde der prozentuale Anteil an T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten in Knochenmark (KM), Milz, peripherem Blut (PB) und Thymus bestimmt (vgl. 7.1.11). **(A)** Anteil B-Zellen in KM, Milz und Blut, sowie Unterscheidung zwischen unreifen ($B220^+CD93^+$) und reiferen ($B220^+CD93^-$) B-Zellen innerhalb ihrer Entwicklung im KM. **(B)** Anteil an T-Zellen gesamt und unterteilt in $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen in KM, Milz und PB, sowie Nachverfolgung der T-Zell Entwicklung im Thymus, ausgehend von CD4/CD8 doppelt-negativen (DN), über CD4/CD8 doppelt-positive (DP) bis hin zu reifen CD4 beziehungsweise CD8 *single*-positiven T-Zellen. **(C)** Anteil an Makrophagen/Monozyten und **(D)** Anteil an Granulozyten in KM, Milz und PB (n=5).

Für die Untersuchung des Stamm-/Progenitorzellkompartiments wurde das Knochenmark unter Berücksichtigung weiterer Oberflächenmarker im FACS analysiert. LSK-Zellen wurden anhand der Expression von Flk-2 und CD34 in LT-HSZ (Flk-2$^-$CD34$^-$), ST-HSZ (Flk-2$^-$ CD34$^+$) und MPP (Flk-2$^+$CD34$^+$) unterschieden (Abb. 32A). Im Vergleich zu B6[GFP] konnten bei B6[HB9] keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von LT-, ST-HSZ, MPP oder LSK-Zellen gesamt festgestellt werden (Abb. 32B, C).

Im Gegensatz zu der Analyse differenzierter Zellen konnten im Stammzellkompartiment eindeutig HB9-GFP$^+$ Zellen detektiert werden (Abb. 32D).

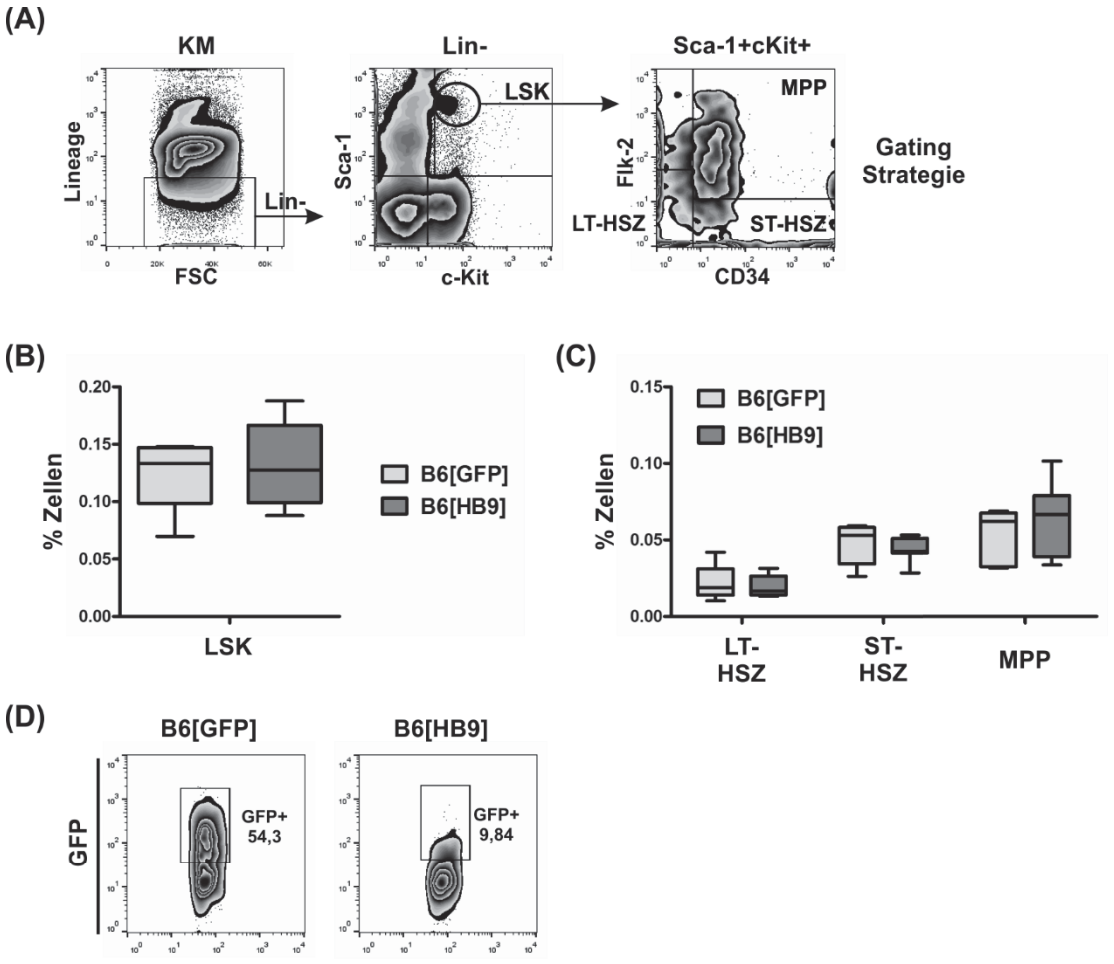

Abb. 32: Untersuchung des hämatopoetischen Stammzellkompartiments in B6[GFP] und B6[HB9]. (A) *Gating* Strategie zur Bestimmung hämatopoetischer Stammzellen im KM mittels FACS-Analyse. LSK (Lin$^-$ Sca-1$^+$cKit$^+$) Zellen wurden weiter unterteilt in LT-HSC (Flk-2$^-$CD34$^-$), ST-HSC (Flk-2$^-$CD34$^+$) und MPP (Flk-2$^+$ CD34$^+$). **(B)** Prozentualer Anteil an LSK Zellen gesamt und **(C)** unterteilt in LT-, ST-HSC und MPP von B6[GFP] und B6[HB9] (n=5). **(D)** Nachweis GFP+ Zellen im LSK-Kompartiment von B6[GFP] und B6[HB9].

Zur Unterscheidung von lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen wurde die Expression des IL7-Rezeptors (IL7Rα) in die Analyse Lin^- Zellen einbezogen. B6[HB9] Mäuse zeigten anteilig deutlich weniger HB9-GFP^+ Zellen in den lymphoiden (Median: 3,9 % $Lin^-IL7R\alpha^+$) als in den myeloiden (Median: 15,1 % $Lin^-IL7R\alpha^-$, p-Wert=0,086) Vorläuferzellen, während bei den B6[GFP] Mäusen der Anteil GFP^+ Zellen in beiden Populationen gleich war (Median: 46,7 % $Lin^-IL7R\alpha^+$ zu 46,5 % $Lin^-IL7R\alpha^-$, p-Wert=0,7; Abb. 33A, C). Die weitere Unterteilung der myeloiden Vorläuferzellen in CMP, GMP und MEP (vgl. 7.1.11) zeigte, dass die HB9-GFP^+ Zellen fast ausschließlich in dem MEP Kompartiment lokalisiert waren (Abb. 33B). Während der Anteil GFP^+ Zellen in allen drei myeloiden Vorläufer-Populationen bei B6[GFP] vergleichbar war, so war bei B6[HB9] die GFP-Expression in der MEP-Population verglichen zu CMP und GMP signifikant erhöht (Abb. 33D). Aus MEPs entstehen im weiteren Verlauf der Differenzierung Thrombozyten und Erythrozyten. Bei beiden Zelltypen handelt es sich um anukleäre Zellen, die somit nicht zur GFP-Expression fähig sind und in der FACS-Analyse nicht berücksichtigt werden konnten, so dass zu der Ausreifung HB9 exprimierender MEPs keine Aussage gemacht werden kann.

Zusammenfassend zeigt die *in vivo* Studie, dass in B6[HB9] Mäusen HB9-GFP^+ Zellen nur im Stamm- und Progenitorzellkompartiment, nicht aber in ausgereiften Zellpopulationen detektiert werden konnten. Innerhalb des Progenitorkompartiments konnten HB9-GFP^+ Zellen vermehrt in myeloiden im Vergleich zu lymphoiden Vorläufern beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich eine signifikant gesteigerte HB9-GFP Expression im myeloiden MEP-Kompartiment.
Unabhängig von der GFP Expression wiesen B6[HB9] im Vergleich zu B6[GFP] Mäusen in der Peripherie eine geringe Anzahl an lymphoiden Zellen auf, während der Anteil myeloider Zellen gesteigert war. Eine Leukämieentstehung konnte bei keinem der Tiere beobachtet werden.

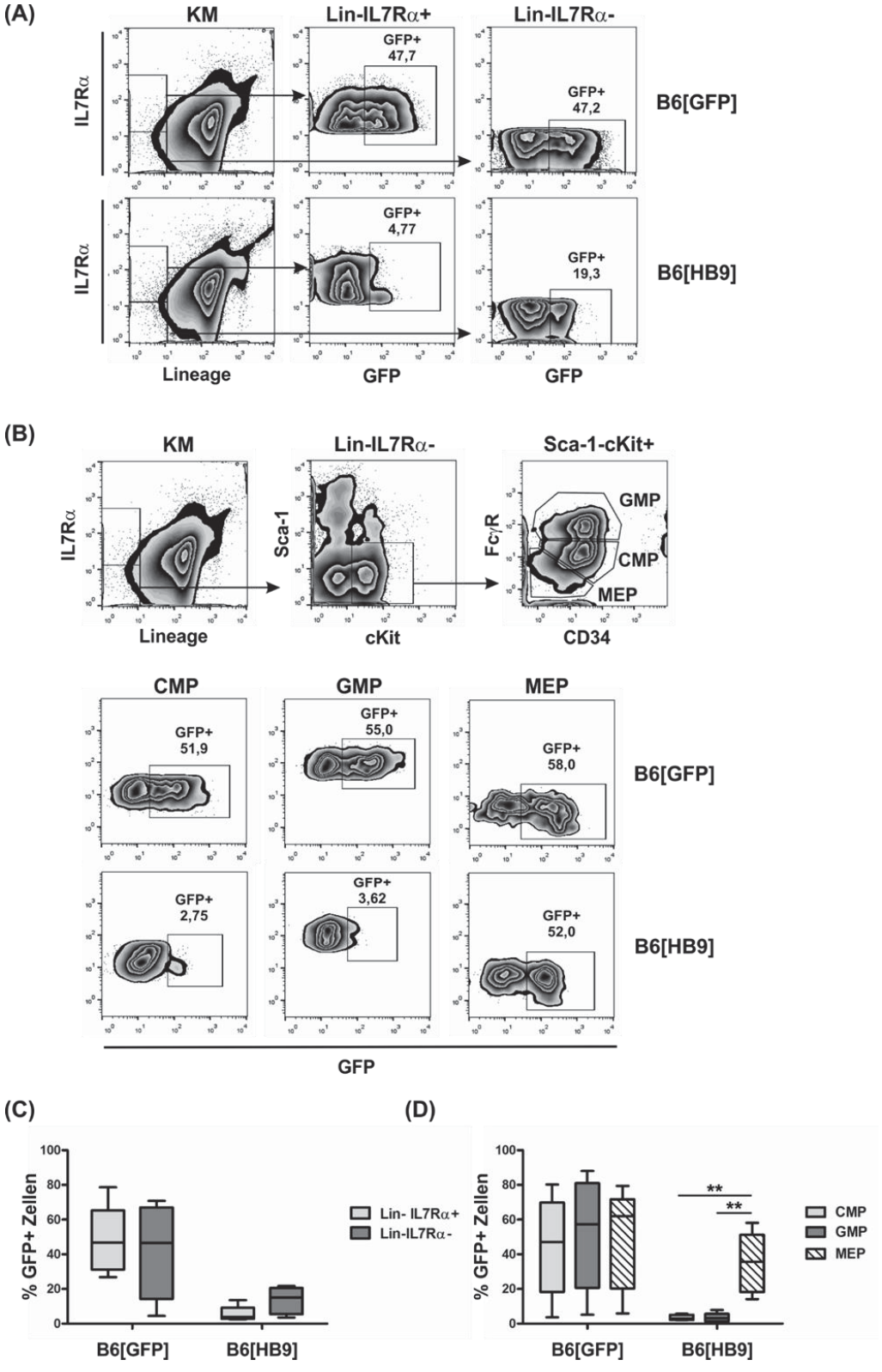

Abb. 33: Analyse lymphoider und myeloider Progenitoren in B6[GFP] und B6[HB9]. (A) Analyse der GFP-Expression lymphoider ($Lin^-IL7R\alpha^+$) und myeloider ($Lin^-IL7R\alpha^-$) Vorläuferzellen im FACS. **(B)** *Gating* Strategie zur Unterteilung der myeloiden Progenitoren in „*common myeloid progenitor* (CMP)“, „*granulocyte-macrophage progenitor* (GMP)“ und „*megakarocyte-erythrocyte progenitor* (MEP)“, sowie deren Analyse auf GFP-Expression im FACS. **(C)** Anteil GFP^+ Zellen im lymphoiden ($Lin^-IL7R\alpha^+$) und myeloiden ($Lin^-IL7R\alpha^-$) Progenitorkompartiment. **(D)** Anteil GFP^+ Zellen an CMP, GMP und MEP (n=5). Signifikante Unterschiede sind markiert mit **($p \leq 0{,}01$).

4.4 Untersuchung möglicher HB9-gerichteter Therapieansätze

AML-Patienten mit Translokation t(7;12) und einhergehender Expression von HB9 haben eine sehr schlechte Prognose. Trotz Chemotherapie und Stammzelltransplantation kommt es in den meisten Fällen innerhalb kürzester Zeit zu einem Rezidiv, sodass die ereignisfreie Überlebensrate innerhalb der ersten drei Jahre bei 0-14 % liegt [75]. Das schlechte Therapieansprechen Translokation t(7;12)$^+$ AML zeigt die Dringlichkeit HB9 gerichtete Behandlungsoptionen zu definieren. Um mögliche Therapieansätze in Bezug auf eine vorhandene HB9-Expression zu untersuchen, wurde ein konstitutiv HB9 exprimierendes Zellsystem etabliert und auf Suszeptibilität gegenüber pharmakologischen Wirkstoffen untersucht. Hierfür wurde die promyelozytäre AML-Zelllinie HL-60 verwendet [158], die aufgrund ihres geringen Differenzierungsgrades (FAB-M2) [159] den Blasten Translokation t(7;12)$^+$ Patienten ähnelt und deswegen bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe Anwendung fand.

4.4.1 Charakterisierung des HL60[HB9] Zellmodells

HL-60 Zellen wurden lentiviral mit GFP (HL60[GFP]) oder HB9-GFP (HL60[HB9]) transduziert und auf GFP-Expression mittels FACS sortiert, so dass der Anteil GFP$^+$ Zellen bei über 95 % lag (Abb. 34A). qRT-PCR und Westernblot-Analysen bestätigten die Expression von HB9 in HL60[HB9], während in HL60[GFP] keine Expression von HB9 detektiert werden konnte (Abb. 34B, C).

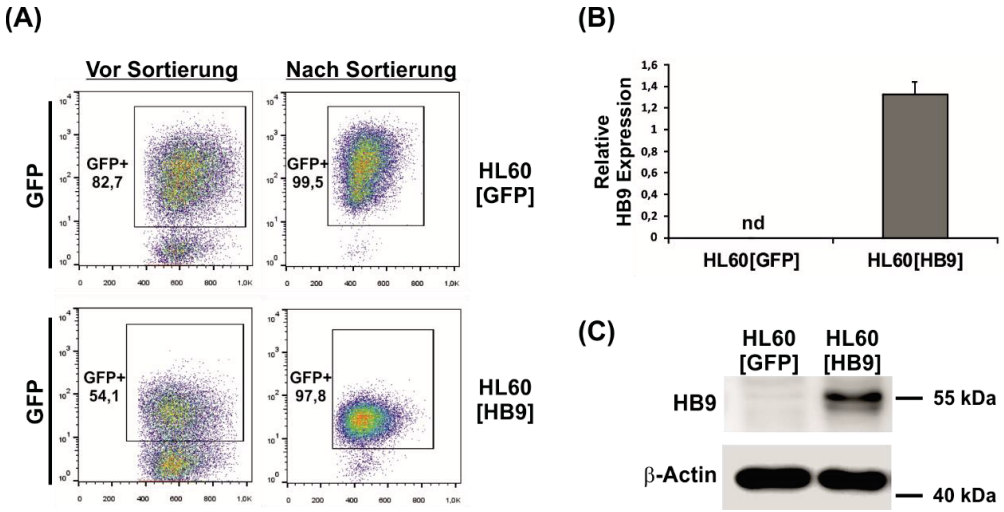

Abb. 34: Nachweis der Transgen-Expression in HL-60 Zellen. (A) FACS-Analyse der GFP-Expression: HL60 Zellen wurden mit [HB9] (HL60[HB9]) beziehungsweise [GFP] (HL60[GFP]) transduziert und zwei Wochen nach Transduktion auf die Expression von GFP mittels FACS sortiert. **(B)** qRT-PCR Analyse zum Nachweis der HB9 Expression in HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP], relativ zu β-Aktin; nd = nicht detektierbar (n=4). **(C)** Westernblot-Analyse zum Nachweis von HB9 auf Proteinebene. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Für die geplanten Versuche wurden vier biologische Replikate (Set A-D) generiert, in denen HL-60 Zellen separat mit [GFP] beziehungsweise [HB9] transduziert und sortiert wurden. Über die gesamte Kultivierungsdauer wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mittels FACS auf GFP-Expression analysiert und waren zu jedem Zeitpunkt zu über 95 % GFP^+.

In Proliferationsanalysen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen HL60[HB9] und HL60[GFP] beobachtet werden (Abb. 35). Ein Proliferationsarrest wie er in HT1080 und NIH3T3 durch HB9 induziert wurde (vgl. 4.2.1), war nicht zu erwarten, da HL-60 Zellen eine homozygote p53-Deletion tragen.

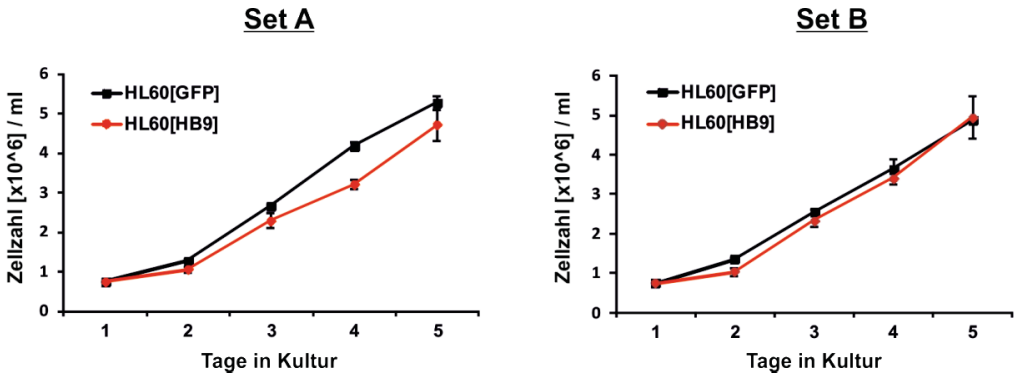

Abb. 35: Proliferationsanalyse von HL-60 Zellen nach Transduktion von HB9. HL60[HB9] beziehungsweise HL60[GFP] wurden an Tag 1 für die Proliferationsanalyse ausgesät ($7{,}5*10^5$ Zellen/ml) und über vier Tage täglich Triplikate ausgezählt. Die Proliferationsanalyse wurde an zwei der vier generierten HL60[HB9] beziehungsweise HL60[GFP] Zelllinien (Set A+B) durchgeführt.

Des Weiteren wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. HL60[HB9] zeigten im Vergleich zu HL60[GFP] einen signifikanten Rückgang der G1-Phase, bei einem gleichzeitigen Anstieg der aneuploiden (> 4n) Population (Abb. 36A, B).

In der Zellzyklusanalyse kann nicht zwischen diploiden Zellen, die sich in der G2/M-Phase befinden, und aneuploiden Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, unterschieden werden, da beide Zellpopulationen denselben DNA-Gehalt aufweisen. Fasst man die Zellen der G2/M und > 4n-Phase zusammen, um die aneuploiden Zellen in jeder Phase ihres Zellzyklus abzudecken, so konnte bei HL60[HB9] ein signifikanter Anstieg an aneuploiden Zellen beobachtet werden (Abb. 37A). Der Rückgang an diploiden Zellen, gemessen an der G1- und S-Phase, und die Zunahme an aneuploiden Zellen (≥ 4n) bei HL60[HB9] wurde bei jeder vorgenommenen Messung beobachtet und verstärkte sich sukzessive über den Zeitraum nach Transduktion (Abb. 37B).

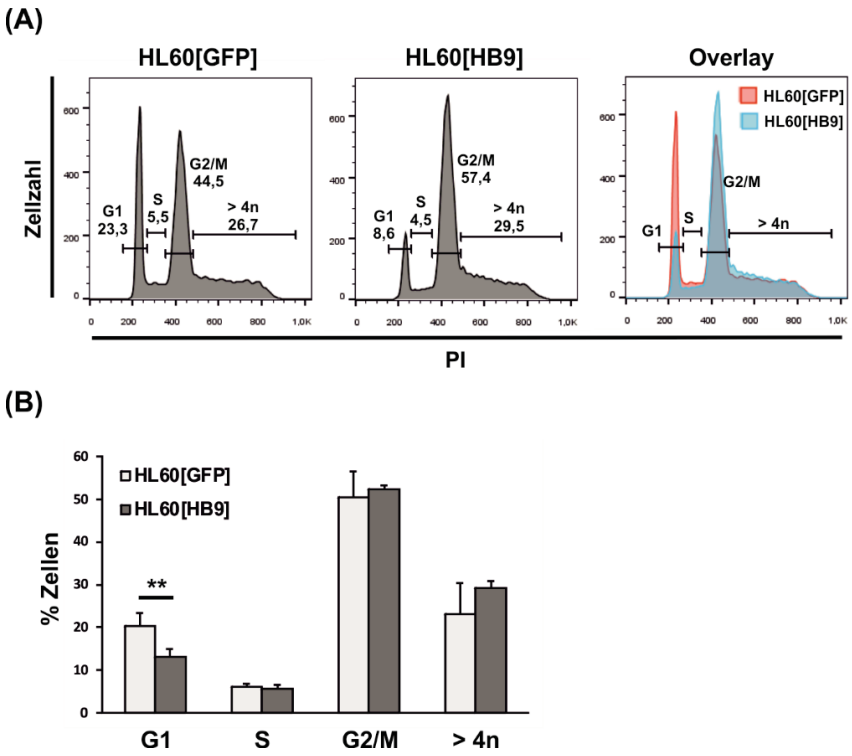

Abb. 36: Zellzyklusanalyse von HL60[HB9] und HL60[GFP]. (A) FACS-Analyse des Zellzyklus von HL60[HB9] und HL60[GFP]. Dargestellt sind die einzelnen Histogramme zu HL60[GFP] und HL60[HB9], sowie eine Überlagerung derselben (Overlay). **(B)** Statistische Auswertung der FACS-Analyse zum Zellzyklus in HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen für die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Signifikante Unterschiede sind markiert mit **($p \leq 0{,}01$) (n=4).

Zur Überprüfung der These, dass die Expression von HB9 zu Aneuploidie führt, wurden stabil transfizierte HL-60 Zellen, die HB9 unter Kontrolle des CMV Promotors exprimieren [104], mittels Zellzyklusanalyse untersucht.

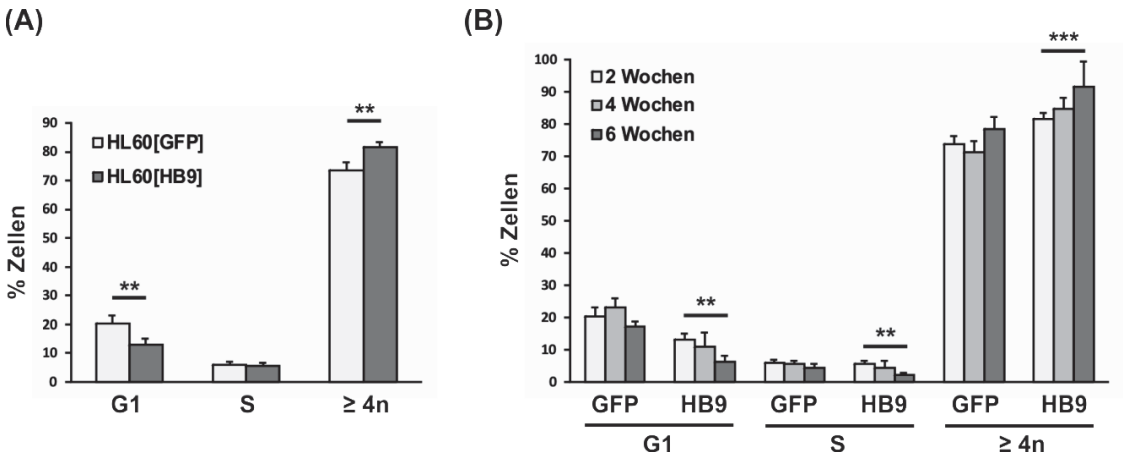

Abb. 37: Zellzyklusanalyse von HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP] über einen Zeitraum von zwei bis sechs Wochen nach Transduktion. Auswertung der FACS-Analyse zum Zellzyklus in HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP] zum Zeitpunkt 2 Wochen nach Transduktion **(A)** und über 6 Wochen **(B).** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen für die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Die G2/M und > 4n Phase wurden unter ≥ 4n zusammengefasst, um aneuploide Zellen in jeder Phase ihres Zellzyklus abzudecken. Signifikante Unterschiede sind markiert mit **($p \leq 0{,}01$) und mit ***($p \leq 0{,}001$) (n=4).

Diese Zellen waren über sechs Monate unter anhaltendem Selektionsdruck durch Puromycin kultiviert worden, so dass nur die Zellen mit der stärksten HB9 Expression selektioniert wurden. Die Analyse zeigte, dass die HB9-exprimierenden Zellen (HL60_HB9-Puro) nur noch aus aneuploiden Zellen bestanden, während die Leervektor transfizierten Zellen (HL60_Mock-Puro) vornehmlich diploid waren (Abb. 38). Während der Selektion scheint die Expression von HB9 zu einer Akkumulation aneuploider Zellen geführt zu haben, bei einem völligen Verlust von diploiden Zellen. Dies bestätigt die Beobachtung in den transduzierten HL-60 Zellen (vgl. Abb. 37), in denen die HB9-Expression zu einer Anreicherung von aneuploiden Zellen führte.

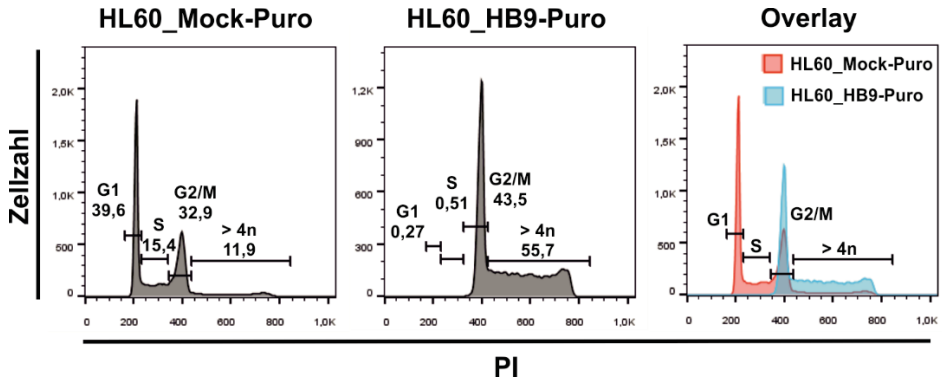

Abb. 38: Zellzyklusanalyse stabil mit HB9 transfizierter HL-60 Zellen. HL-60 Zellen, stabil transfiziert mit HB9 (HL60_HB9-Puro) beziehungsweise dem Leervektor (HL60_Mock-Puro) wurden in Zellzyklusanalysen untersucht. Zum Zeitpunkt der Zellzyklusanalyse waren die Zellen seit mehr als sechs Monaten unter Selektionsdruck kultiviert worden. Dargestellt sind die einzelnen Histogramme zu HL60_Mock-Puro und HL60_HB9-Puro, sowie eine Überlagerung derselben (Overlay).

4.4.2 Untersuchung von ATRA zur Behandlung HB9 exprimierender AML

Durch die Zugabe von ATRA kann die Ausdifferenzierung myeloider Vorläuferzellen induziert werden, wobei ATRA an Retinsäurerezeptoren bindet und so die Expression nachgeschalteter Gene reguliert [134, 160]. Aufgrund dieser Wirkung wird ATRA bereits effizient in der Behandlung Translokation t(15;17)-positiver akuter promyelozytärer Leukämie angewandt und führt über Ausdifferenzierung und Apoptose der Blasten zur Remission [161]. Genexpressionsstudien zeigten, dass Translokation t(15;17) und t(7;12)-positive Patienten ähnliche Expressionsprofile aufweisen [162]. Basierend darauf sollte die Suszeptibilität HB9-exprimierender AML Zellen gegenüber Behandlung mit ATRA untersucht werden.

Als Modell wurden HL60[HB9] beziehungsweise HL60[GFP] Zellen verwendet und die ATRA-induzierte Differenzierung anhand der Expression von CD38 als frühem und CD11b als spätem myeloischen Differenzierungsmarker gemessen.

In einem Vorversuch wurden verschiedene ATRA-Konzentrationen getestet und die Expression von CD11b analysiert. Eine Induktion der CD11b- Expression konnte bereits bei 0,2 µM ATRA nachgewiesen werden (HL60[GFP]: 7,4 % CD11b+ und HL60[HB9]: 45,6 % CD11b+) und stieg dosisabhängig auf 16,1 % bei HL60[GFP] beziehungsweise 75,9 % bei HL60[HB9] an (Abb. 39).

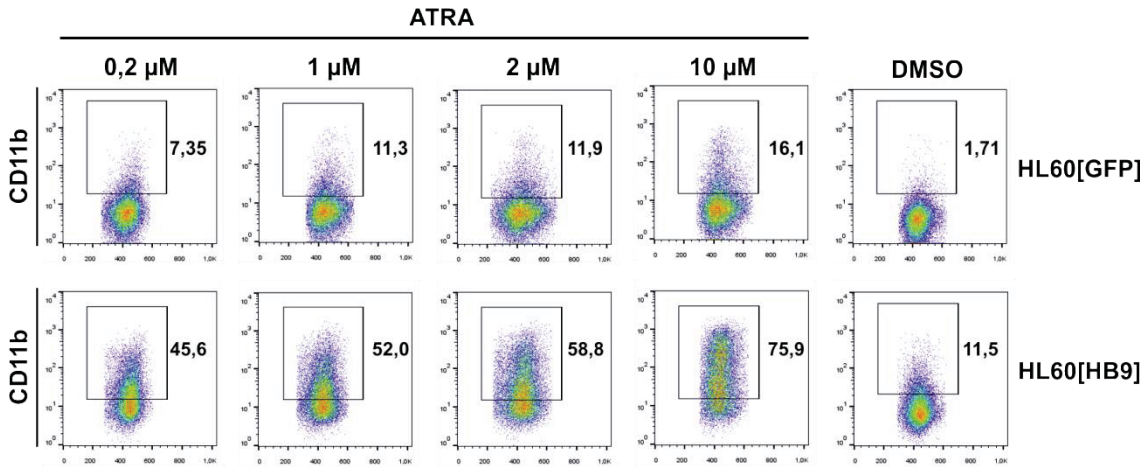

Abb. 39: Testung verschiedener ATRA-Konzentrationen zur Induktion der CD11b-Expression. HL60[GFP] und HL60[HB9] Zellen wurden für 72 h mit 0,2/1/2/10 µM ATRA inkubiert und die CD11b-Expression im FACS bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen an Solvens (DMSO) inkubiert.

Für die weiteren Experimente wurden ATRA-Konzentrationen von 1 µM und 10 µM verwendet, um mögliche dosisabhängige Unterschiede zu detektieren. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit gleicher Konzentration des Solvens DMSO behandelt.

Bereits bei Inkubation mit 1 µM ATRA stieg der Anteil $CD38^+$ Zellen sowohl bei HL60[GFP] als auch bei HL60[HB9] auf über 70 % an (Abb. 40A, B). Die Behandlung mit 10 µM ATRA zeigte eine nicht erhebliche, dennoch signifikante Steigerung auf ~80 %.

Während sich HL60[GFP] und HL60[HB9] hinsichtlich der Expression von CD38 als frühem myeloischen Differenzierungsmarker vergleichbar verhielten, zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression des späten Differenzierungsmarkers CD11b. Die Behandlung mit 1 µM ATRA führte bei HL60[GFP] zu 10,5 % und bei HL60[HB9] zu 68 % CD11b+ Zellen (Abb. 40C). Unter Verwendung von 10 µM ATRA stieg der Anteil CD11b+ Zellen bei HL60[GFP] auf 18,5 % und bei HL60[HB9] auf 93 % an. Zusätzlich konnte bei HL60[HB9] eine signifikante, ATRA-unabhängige gesteigerte Expression von CD11b (10,3 %) verglichen zu HL60[GFP] (1,9 %) in den DMSO-Kontrollen detektiert werden.

Um auszuschließen, dass die signifikanten Unterschiede in der CD11b-Expression auf einer langsameren Differenzierung von HL60[GFP] beruhen, wurde die Inkubationszeit verlängert

und die Messung erneut durchgeführt, zeigte jedoch nur eine geringfügige Steigerung an $CD11b^+$ Zellen bei HL60[GFP] (Abb. 40D).

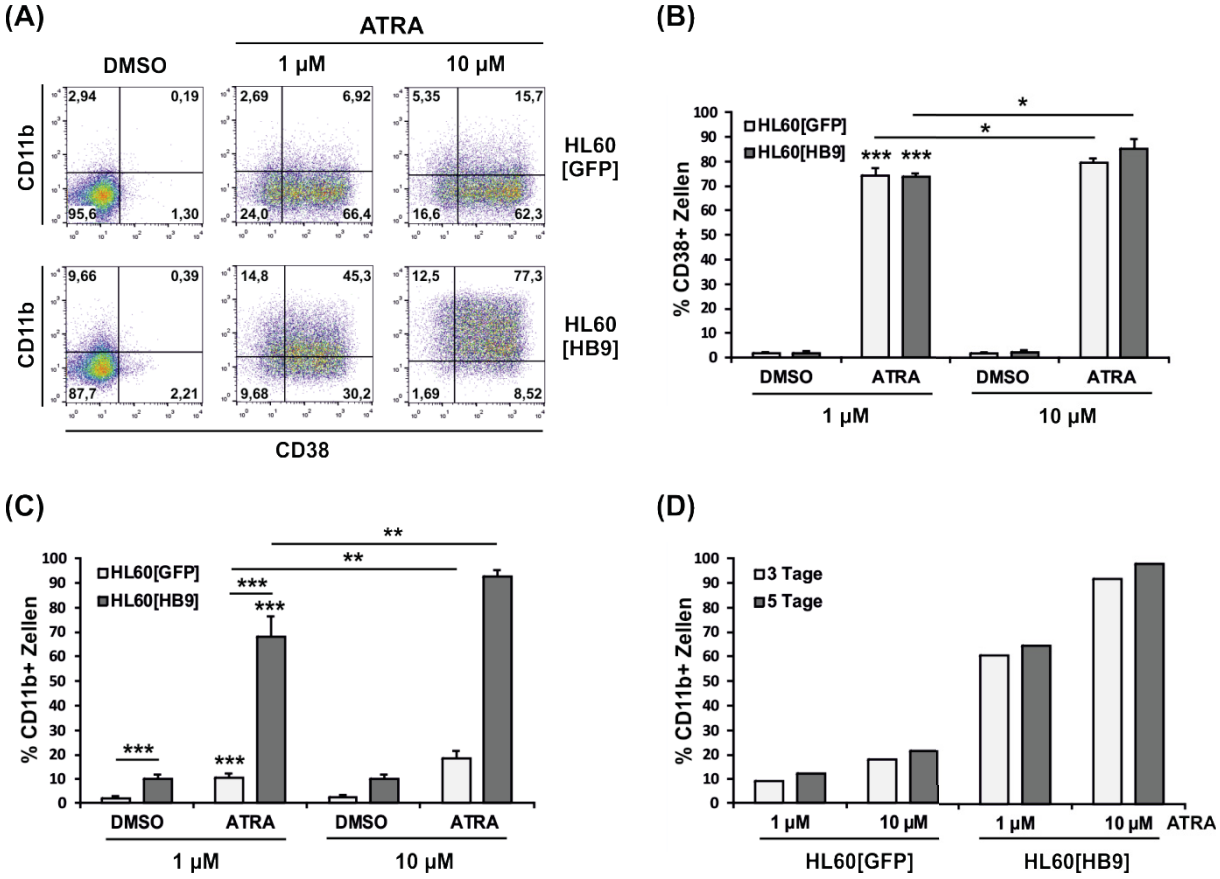

Abb. 40: ATRA-induzierte Differenzierung von HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. (A) FACS-Analyse früher (CD38) und später (CD11b) myeloischer Oberflächenmarker als Maß für die ATRA-induzierte Differenzierung nach 72 h Inkubation. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen an Solvens (DMSO) inkubiert. **(B)** Auswertung der FACS-Analyse in Bezug auf den Anteil $CD38^+$ Zellen. **(C)** Auswertung der FACS-Analyse in Bezug auf den Anteil $CD11b^+$ Zellen. Wenn nicht anders indiziert bezieht sich die Signifikanz der Werte auf den Vergleich mit den entsprechenden DMSO-Kontrollen. Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$) und mit ***($p \leq 0,001$) (n=4). **(D)** Auswertung der FACS-Analyse in Bezug auf die CD11b-Expression nach 3 und 5 tägiger Inkubation mit ATRA (n=2).

Im Rahmen der Differenzierung kann es zu Verschiebungen im Zellzyklus (G1-Arrest) und zur Induktion von Apoptose kommen, weshalb diese Parameter ebenfalls in HL60[HB9] und HL60[GFP] analysiert wurden.

Entsprechend des erwarteten G1-Arrests konnte bei HL60[GFP] ein Rückgang der Zellen in der G2/M-Phase und bei HL60[HB9] ein Rückgang der Zellen in der G2/M- und der > 4n-Phase beobachtet werden (Abb. 41). Einhergehend kam es zu einem Anstieg an apoptotischen Zellen (subG1). HL60[HB9] Zellen zeigten gegenüber ATRA-induzierter Apoptose eine gesteigerte Sensitivität, da im Gegensatz zu HL60[GFP] bereits bei 1 µM ATRA ein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen beobachtet werden konnte.

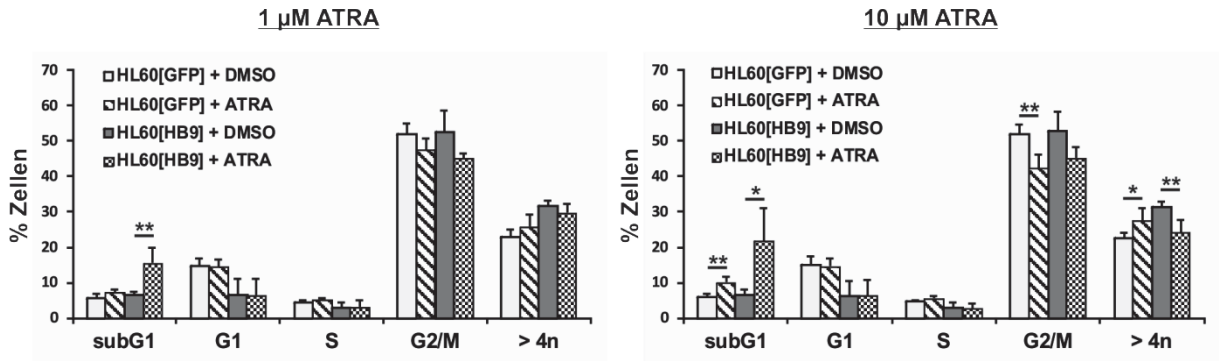

Abb. 41: Zellzyklusanalyse von HL60[GFP] und HL60[HB9] nach ATRA-Behandlung. HL60[GFP] und HL60[HB9] wurden für 72 h mit 1/10 µM ATRA inkubiert und der Zellzyklus mittels FACS analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen an Solvens (DMSO) inkubiert. Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0,05$) und mit **($p \leq 0,01$) (n=4).

Zur Verifizierung der Apoptoserate wurden die Zellen mit Annexin und 7AAD angefärbt und im FACS analysiert (vgl. 3.3.12.3). Sowohl bei Induktion mit 1 µM als auch mit 10 µM ATRA konnte nur bei HL60[HB9] ein signifikanter Anstieg an apoptotischen $Annexin^+/7AAD^+$ Zellen gemessen werden, während bei HL60[GFP] keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (Abb. 42A, B).

Um die einsetzende Apoptose zu einem früheren Zeitpunkt detektieren zu können, wurde die Caspase 3/7-Aktivität in den Zellen gemessen (vgl. 3.3.16). Während HL60[HB9] bereits bei einer Induktion mit 1 µM ATRA eine gesteigerte Caspase 3/7-Aktivität aufwiesen, zeigte sich diese bei HL60[GFP] erst bei einer Induktion mit 10 µM ATRA (Abb. 42C).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass HL60[HB9] im Vergleich zu HL60[GFP] eine gesteigerte Sensitivität gegenüber ATRA-induzierter Differenzierung aufweisen und in Folge der Differenzierung in die Apoptose übergehen.

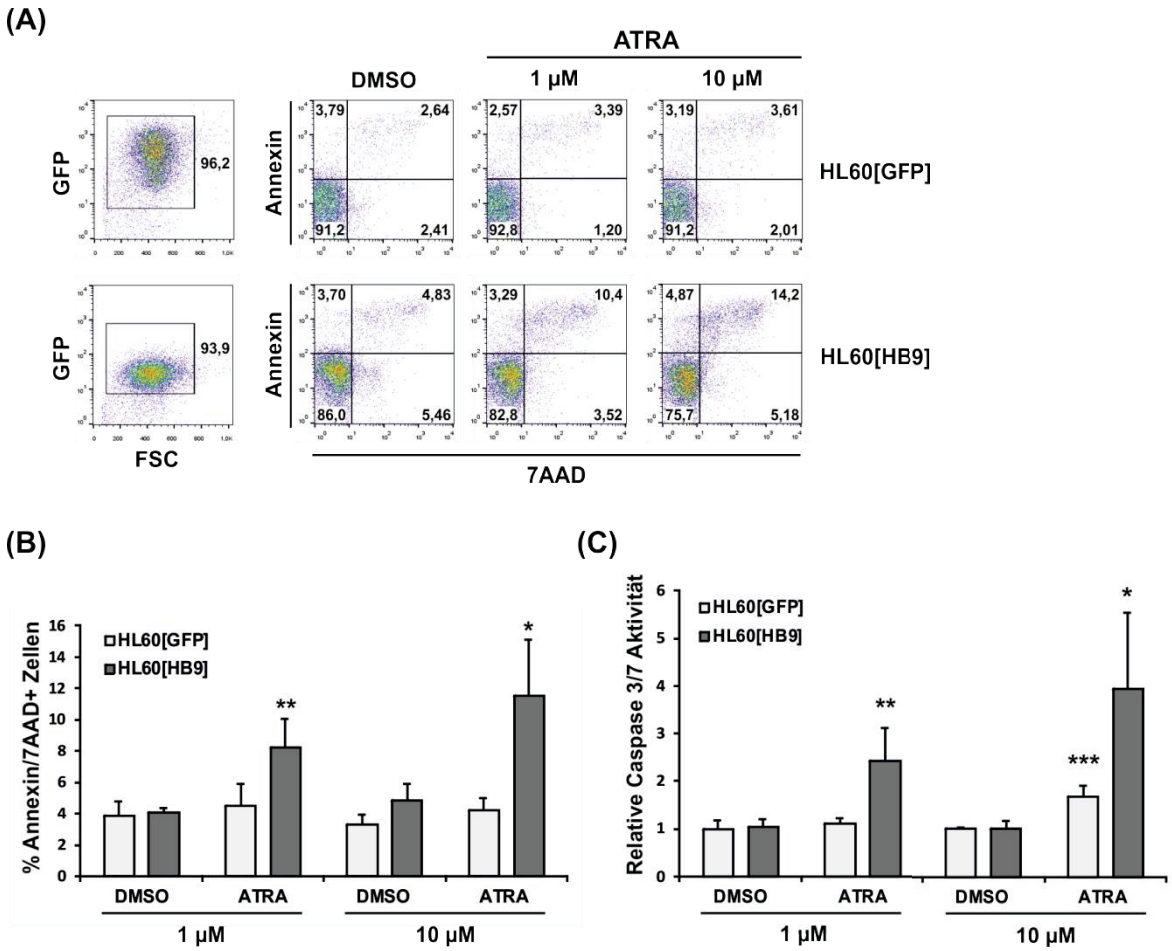

Abb. 42: Messung der ATRA-induzierten Apoptose in HL60[GFP] und HL60[HB9]. (A) HL60[GFP] und HL60[HB9] wurden für 72 h mit 1 µM beziehungsweise 10 µM ATRA inkubiert, mit Annexin und 7AAD gefärbt und im FACS analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge an Solvens (DMSO) inkubiert. Die Analyse der GFP-Expression bestätigte, dass 100 % der Zellen das Transgen zum Analysezeitpunkt exprimierten. **(B)** Prozentualer Anteil apoptotischer Annexin^{+}7AAD^{+} Zellen. **(C)** Messung der relativen Caspase 3/7-Aktivität. Es wurde zum Messwert von HL60[GFP] 1 µM DMSO-Kontrolle normalisiert. Angaben zur Signifikanz beziehen sich auf den Vergleich zu der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0{,}05$), **($p \leq 0{,}01$) und mit ***($p \leq 0{,}001$) (n=4).

4.4.3 Wirkstoff-*Screening* zur Behandlung HB9-positiver AML

Um neue Substanzen zur spezifischen Behandlung HB9-exprimierender AML zu identifizieren, wurden HL60[HB9] im Vergleich zu HL60[GFP] auf gesteigerte Sensitivität gegenüber bekannten pharmakologischen Wirkstoffen getestet. Zur Verfügung stand eine kommerziell erhältliche Wirkstoffbibliothek von 80 Kinase-Inhibitoren, sowie eine Sammlung von 193 Wirkstoffen, die in der Klinik zur Krebstherapie bereits angewendet werden oder sich zumindest in Phase III bis IV Studien befinden. Die Bereitstellung der Wirkstoffbibliotheken, sowie die Durchführung des *Screenings* erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Hr. Dr. Marc Remke (DKTK Nachwuchsgruppe „Pädiatrische Neuroonkogenomik“; Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie, Düsseldorf).

HL60[GFP] und HL60[HB9] wurden für 72 h mit Verdünnungen der Wirkstoffe (0,005–25 µM) inkubiert und die Zellviabilität anhand der ATP-Menge bestimmt. Die Auswertung erfolgte über Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}), sowie des 95 % Konfidenzintervalls. Als Positiv-Kontrolle wurde der unspezifische Kinase-Inhibitor Staurosporin und als Negativ-Kontrolle das Solvens DMSO eingesetzt.

Innerhalb der Kinase-Inhibitor-Bibliothek zeigte kein Wirkstoff einen signifikanten Unterschied im IC_{50} bei HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP].

Aus der klinischen Wirkstoff-Bibliothek hingegen wurden vier Wirkstoffe identifiziert, bei denen das Konfidenzintervall des IC_{50} für HL60[HB9] nicht mit dem für HL60[GFP] überlappte und HL60[HB9] einen niedrigeren IC_{50} aufwiesen. Diese umfassten: Canertinib (Pan-ErbB Tyrosin Kinase Inhibitor), Fosbretabulin (Mikrotubuli-Destabilisator), Entinostat (Histon-Deacetylase Inhibitor) und ABT-199 (selektiver BCL-2 Inhibitor; Abb. 43A).

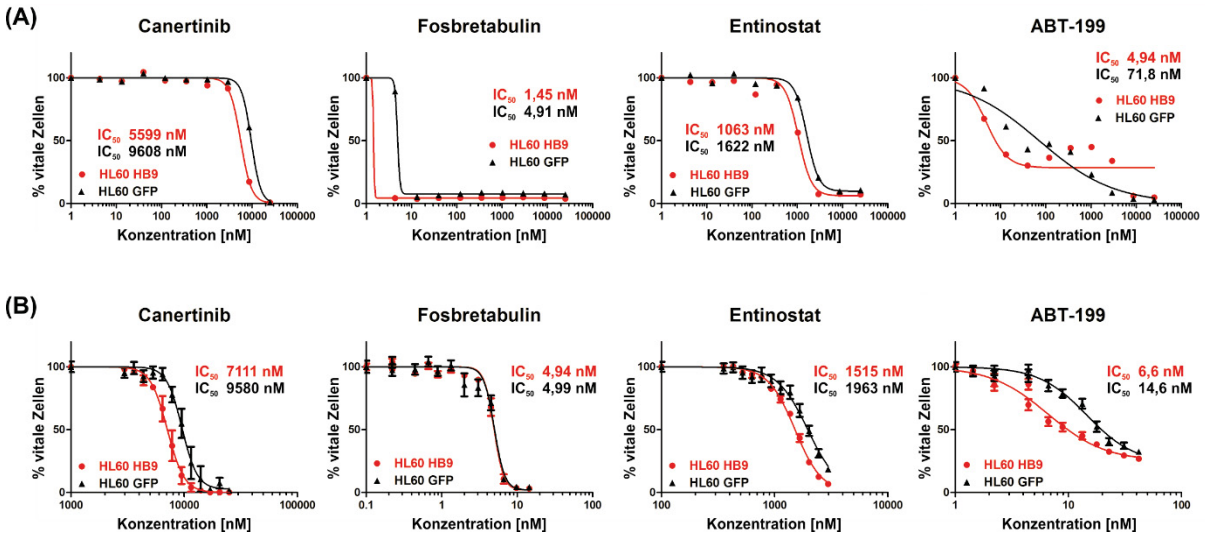

Abb. 43: Screening klinisch relevanter Wirkstoffe auf HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. (A) HL60[GFP] und HL60[HB9] wurden für 72 h mit 0,005-25 µM des jeweiligen Wirkstoffes inkubiert und der Anteil vitaler Zellen über ATP-Messung bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Solvens DMSO inkubiert und der gemessene Wert mit 100 % Vitalität gleichgesetzt. Es wurde der IC_{50} und das 95 % Konfidenzintervall berechnet (n=1). **(B)** Validierung der Wirkstoffe unter Verwendung angepasster Verdünnungsreihen (n=4).

Für die Validierung der genannten Therapeutika und zur Eingrenzung des IC_{50}, wurden die Zellen erneut mit angepassten Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffs inkubiert. Nach der Neuberechnung des IC_{50} und des 95 % Konfidenzintervalls konnten drei der vier Kandidaten validiert werden: TSU-68, ABT-199 und Canertinib (Abb. 43B). Von diesen drei Wirkstoffen erschien ABT-199 als interessanter Wirkstoffkandidat, da der IC_{50} von HL60[HB9] bei weniger

als der Hälfte der Konzentration des IC_{50} von HL60[GFP] lag, und somit ein therapeutisches Fenster eröffnet.

ABT-199 ist ein selektiver BCL-2 Inhibitor [163], der bereits Anwendung in der Behandlung bestimmter Leukämieentitäten findet. BCL-2 (B-cell lymphoma 2) ist ein Mitglied der BCL-2 Protein-Familie und fungiert antiapoptotisch. In vielen Krebsarten liegt BCL-2 überexprimiert vor und verhindert dadurch eine Apoptose der Krebszellen [164].

Um zu untersuchen, wie sich die Expression von HB9 in den HL60[HB9] Zellen auf die Expression von BCL-2 auswirkt und so die Suszeptibilität gegenüber dem BCL-2 spezifischen Inhibitor ABT-199 erhöht, wurde die Expression von BCL-2 auf Proteinebene untersucht.

Im Westernblot konnte bei HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP] eine reduzierte BCL-2 Expression (1,5 x) beobachtet werden, deren Signifikanz durch densitometrische Auswertung belegt wurde (Abb. 44).

Aufgrund der signifikant verringerten Proteinmenge an BCL-2 in HL60[HB9] ist eine geringere Konzentration an ABT-199 ausreichend, um BCL-2 zu inhibieren, woraus sich die erhöhte Suszeptibilität von HL60[HB9] ergibt. Mit ABT-199 konnte neben ATRA ein weiterer interessanter Kandidat zur Behandlung HB9-exprimierender AML identifiziert werden.

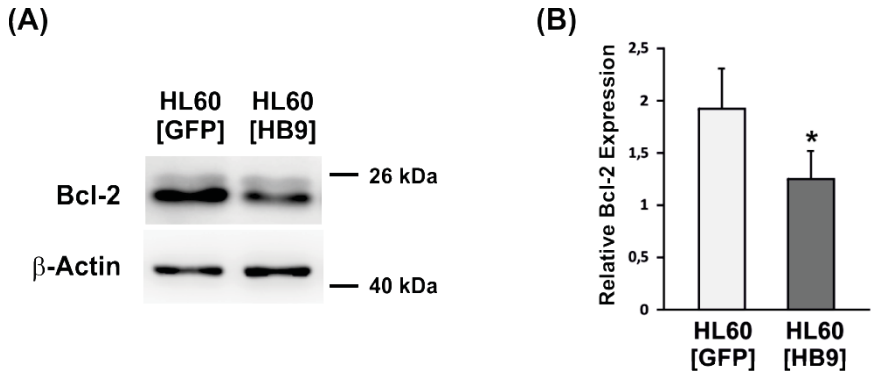

Abb. 44: Untersuchung zur Expression von BCL-2 in HL60[HB9] verglichen zu HL60[GFP]. (A) Westernblot-Analyse der BCL-2 Expression in HL60[GFP] und HL60[HB9]. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. **(B)** Zur Bestimmung der relativen BCL-2 Expression wurden die Banden im Westernblot densitometrisch ausgewertet und zu β-Aktin normalisiert. Signifikante Unterschiede sind markiert mit *($p \leq 0,05$) (n=4).

5 Diskussion

Translokation t(7;12)-positive AML-Patienten weisen eine ektope Expression des Homöobox-Gens *HLXB9* auf [75]. HLXB9 kodiert für den Transkriptionsfaktor HB9, welcher funktionell an der Pankreasentwicklung, sowie der neuronalen Differenzierung beteiligt ist [93, 97, 100]. Eine physiologische Expression von HB9 in hämatopoetischen Zellen ist nicht eindeutig belegt. Welche Rolle HB9 in der Leukämogenese Translokation t(7;12)-positiver AML einnimmt ist unklar. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Expression von HB9 auf HSPZ hat und so zur Leukämieentstehung beitragen könnte, wurden (1) Expressionsanalysen in $CD34^+$ HSPZ, (2) funktionelle Analysen in Zelllinienmodellen, die den Einfluss von HB9 auf Zellzyklus und Proliferation untersuchen, durchgeführt und (3) ein murines Transplantationsmodel verwendet, um den Einfluss einer HB9 Expression auf die hämatopoetische Differenzierung und ein mögliches onkogenes Potential *in vivo* zu untersuchen.
Zur Identifizierung möglicher HB9 gerichteter Therapieansätze wurde (4) die Suszeptibilität HB9 exprimierender Zellen im HL-60 Zellmodell gegenüber verschiedenen klinisch relevanten Wirkstoffen untersucht.

5.1 Einfluss von HB9 auf das Genexpressionsprofil $CD34^+$ HSPZ

Um HB9-abhängige Veränderungen in der Genexpression von HSPZ zu analysieren, wurden $CD34^+$ Nabelschnurblutzellen lentiviral mit HB9 oder dem Leervektor transduziert und das Expressionsprofil mittels RNAseq analysiert. Eine Expression von HB9 konnte nur in den mit HB9, nicht aber in den Leervektor transduzierten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10B, C). Dies bestätigt vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe an $CD34^+$ HSPZ isoliert aus Knochenmark, die ebenfalls keine HB9-Expression zeigten [104].
Die RNAseq-Analyse zeigte eine differentielle Expression von 824 Genen in CD34[HB9], von denen 53 % hoch- und 47 % herunterreguliert waren. Von den 117 Genen, die einen FC $\geq$ 1,8 aufweisen (vgl. Tab. 16), sind 62 % hoch- und 38 % herunterreguliert, wodurch gezeigt wird, dass HB9 in HSPZ zu einem größeren Anteil Transkriptions-aktivierend als reprimierend wirkt. Dies steht im Gegensatz zu Expressionsanalysen von HB9 in der AML-Zelllinie HL-60, sowie im neuronalen System, welche HB9 prädominant als Transkriptions Repressor beschreiben [100, 104].
Verglichen zu HL-60 weisen $CD34^+$ HSPZ einen deutlich geringeren Differenzierungsgrad auf. Die Funktion von HB9 als Transkriptionsaktivator oder -Repressor könnte je nach

Differenzierungsgrad der Zelle variieren. Infolgedessen würde HB9 in undifferenzierten Zellen als Transkriptionsaktivator und in weiter differenzierten Zellen als Repressor fungieren. Der funktionelle Unterschied von HB9 könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den HL-60 Zellen nicht um primäre, unveränderte Zellen, sondern um eine immortalisierte AML-Zelllinie handelt.

Unter den heraufregulierten Genen befanden sich 6 Gene, deren Transkription *de novo* durch HB9 induziert wurde (vgl. 4.1.4). Drei dieser Gene, HBZ, MT1X und SLC4A1 sind mit der fötalen Erythropoese assoziiert.

Um biologische Prozesse zu identifizieren, die durch HB9 verändert werden, wurden die differentiell regulierten Gene einer GO-Term Analyse unterzogen (vgl. Abb. 12). Diese zeigte eine positive Anreicherung von Biosynthese assoziierten Prozessen, verbunden mit DNA-Replikation, ribosomaler Biogenese, Transkription, Translation und Zellzyklus. Neben allgemein Zellzyklus bezogenen GO-Terms zeigte sich insbesondere eine Anreicherung von Mitose bezogenen Prozessen. Eine kongruente Anreicherung Zytokinese-assoziierter Prozesse wurde nicht beobachtet, und indiziert somit einen Zellzyklusarrest in der M-Phase.

Diese These wird durch die negative Anreicherung von Aktin-/Zytoskelett-Organisation assoziierten GO-Terms unterstützt, da das Zytoskelett sowohl für die Ausbildung des Spindelapparates als auch für die Zytokinese eine essentielle Rolle spielt [165, 166].

Weiterhin sind GO-Terms der Embryonalentwicklung und der Entwicklung des Nervensystems negativ angereichert, Systeme in denen HB9 physiologisch exprimiert wird und als transkriptioneller Repressor agiert [100].

Die weiteren negativ regulierten Prozesse umfassen GO-Terms, die mit Signaltransduktion in Form von Protein Phosphorylierung und intrazellulären Signalkaskaden assoziiert sind. Insbesondere zeigte sich eine negative Anreicherung von G-Protein gekoppelten Signalkaskaden, wie Ras-Raf-MAP- und cAMP-*Signaling*. Beide Signaltransduktions-mechanismen sind unter anderem mit PGE2 vermittelter Signalübertragung assoziiert [116, 167], für die eine negative Regulation durch HB9 bereits gezeigt wurde [104].

5.1.1 HB9 reduziert die Expression von *PTGER2* und *HPGD* in CD34$^+$ HSPZ

Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass HB9 in HL-60 Zellen an den *PTGER2*-Promotor bindet und dessen Transkription reprimiert [104]. *PTGER2* kodiert für den Prostaglandin E Rezeptor EP2, einen von vier PGE2 Rezeptoren, die intrazellulär über verschiedene Signaltransduktionskaskaden agieren [115]. Die Bindung von PGE2 an EP2 führt zu einer

gesteigerten Produktion von cAMP, gefolgt von Induktion cAMP/PKA-abhängiger Genexpression [116]. Als Folge der HB9-abhängigen Repression von *PTGER2* kam es zu einer Reduktion der cAMP-Konzentration in den HL60-Zellen [104].

Die Analyse der differentiell regulierten Gene in CD34[HB9] zeigte eine 1,8 fache Reduktion von *PTGER2*, die über qRT-PCR validiert wurde (vgl. Abb. 13). Die durch HB9 verringerte Expression von *PTGER2* könnte der Grund für die negative Anreicherung G-Protein- und cAMP-assoziierter GO-Terms in CD34[HB9] sein.

PGE2 ist das häufigste Prostaglandin im menschlichen Körper und ist an einer Vielzahl physiologischer wie auch pathologischer Vorgänge beteiligt [168]. Im hämatopoetischen System ist PGE2 in die embryonale als auch adulte Hämatopoese involviert. In der Embryonalentwicklung beeinflusst PGE2 positiv die Entstehung HSZ in der AGM-Region [169], während es in der adulten Hämatopoese als Botenstoff in der HSZ Nische das *Engraftment* der HSZ unterstützt. In der Nische wird PGE2 von Stroma-Zellen wie Osteoblasten und Monozyten/Makrophagen sekretiert [21], welche dadurch das *Homing* sowie das Proliferationspotential der HSZ positiv beeinflussen [170]. Da PGE2 zu einer gesteigerten Proliferation von HSZ führt, könnte ein verringertes PGE2-*Signaling* dazu führen, dass diese HSZ seltener den Zellzyklus durchläuft. In einer leukämischen Stammzelle könnte dies als chemoprotektiver Mechanismus fungieren (vgl. 1.3.1), der mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht, wie es für Translokation t(7;12)-positive Patienten beschrieben ist [75, 85].

Neben dem Proliferationspotential, könnte auch das Differenzierungspotential der $CD34^+$ HSPZ negativ beeinflusst werden. Während der Differenzierung von HSZ zu MPP nimmt die Expression von *PTGER2* zu [171], so dass eine verringerte *PTGER2* Expression zu einem Differenzierungsstop im MPP Stadium führen könnte. Dieser frühe Differenzierungsarrest würde mit dem Differenzierungsstadium der Blasten Translokation t(7;12)-positiver Patienten übereinstimmen, welche gekennzeichnet sind durch eine hohe Expression Stammzell-assoziierter Antigene wie c-Kit und CD117, sowie der Expression sowohl myeloischer als auch lymphatischer Antigene [114].

In CD34[HB9] war zudem die Expression von *HPGD* verringert, dem Enzym, welches für den Abbau von PGE2 verantwortlich ist [172].

Ein Vergleich der differentiell exprimierten Gene in CD34[HB9] mit vorangegangen Expressionsanalysen der Arbeitsgruppe im HL-60 Zellmodell [104] bestätigte, dass auch in den HL-60 Zellen die *HPGD* Expression durch HB9 negativ reguliert war (Tab. 18). Über den Vergleich konnten zudem drei weitere Gene, *Charcot-Leyden Crystal Galectin (CLC),*

Phospholipase D1 (PLD1), Ras-Related Protein Rab-27B (RAB27B), identifiziert werden, die kongruent in beiden hämatopoetischen Zellmodellen durch HB9 differentiell reguliert waren. In beiden Zellmodellen kam es hierbei zu einer Repression dieser Gene in Folge der HB9 Expression.

Die HB9-abhängige negative Regulation von *PTGER2* und *HPGD* in HL-60 wurde zusätzlich anhand des in dieser Arbeit verwendeten HL60[HB9]-Zellmodells verifiziert (Abb. 45).

Tab. 18: Übereinstimmend in CD34$^+$ HSPZ und HL-60 durch HB9 differentiell regulierte Gene.

	CD34[HB9]		HL60_HB9-Puro	
Gene	**FC**	**p-Wert**	**logFC**	**p-Wert**
CLC	-3,47	7,07E-04	-3,38	5,70E-05
HPGD	-2,13	3,28E-02	-1,22	2,90E-02
PLD1	-1,26	2,93E-02	-1,61	5,70E-05
PTGER2	-1,80	7,38E-03	-2,29	5,70E-05
RAB27B	-1,93	3,26E-03	-1,90	4,50E-02

Eine verringerte Expression von *HPGD*, wurde bereits bei Lungen-, Darm-, Brust- und Blasenkrebs festgestellt, meist in Zusammenhang mit Cyclooxygenase-2 Überexpression, dem Enzym, welches an der PGE-2 Synthese beteiligt ist [172]. Der verringerte Abbau durch HPGD führt ebenso wie die Cox-2 Überexpression zu einer gesteigerten Produktion von PGE2.

Eine Sekretion von PGE2 durch die LSZ könnte immunmodulierend wirken und so die LSZ vor dem körpereigenen Immunsystem schützen. Dies wurde bereits für Lungen-Tumorzellen gezeigt, die über PGE2 Sekretion immunsuppressiv wirkende regulatorische T-Zellen modulieren [173]. Gesteigerte Mengen an PGE2 in der Tumor-Umgebung können zudem dendritische Zellen in ihrer Zytokin-Expression beeinflussen, so dass es zu einer verringerten Aktivierung Tumor-spezifischer zytotoxischer T-Zellen kommt [174].

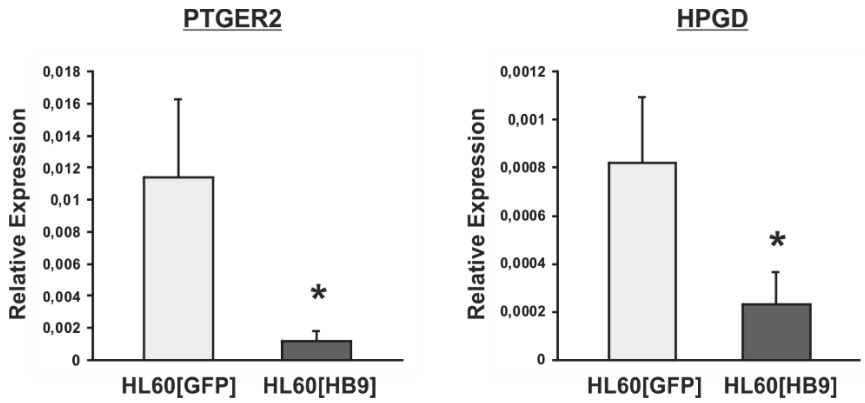

Abb. 45: qRT-PCR zur Validierung der verringerten Expression von *PTGER2* und *HPGD* in HL60[HB9]. qRT-PCR zur Bestimmung der Expression von *PTGER2* und *HPGD* in HL60[GFP] und HL60[HB9], normalisiert zu β-Aktin (n=3).

5.2 HB9 führt zum Zellzyklusarrest und induziert Seneszenz

Die GO-Term Analyse von CD34[HB9] zeigte eine signifikante Anreicherung von Zellzyklus-bezogenen Prozessen (*cell cycle GO 0007049, cell cycle phase*), insbesondere der M-Phase (*M-Phase, M-phase of mitotic cell cycle, mitosis, mitotic cell cycle*; vgl. Tab. 17). Nachfolgend wurde daher der Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus funktional im speziesübergreifenden Zelllinienmodell untersucht. Die Expression von HB9 führte zu einem Proliferationsarrest in humanen HT1080 und murinen NIH3T3 Zellen, der sich innerhalb von 72 h nach Transduktion manifestierte (vgl. Abb. 14). Zellzyklusanalysen zeigten eine signifikante Reduktion der S-Phase, wodurch die Zellen in der G1 und G2/M-Phase des Zellzyklus arretierten (vgl. Abb. 16). Dies bestätigt die aufgrund der GO-Term Analyse aufgestellte These, dass HB9 zu einem Zellzyklusarrest führt.

Neben dem Proliferationsarrest wiesen die HB9-transduzierten Zellen Seneszenz-assoziierte morphologische Veränderungen auf [155], wie eine Vergrößerung des Zellumfangs, bei gleichzeitiger Abflachung, sowie eine signifikante Zunahme an mehrkernigen Zellen (vgl. Abb. 17). Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten weiterhin die Ausbildung von Stressfasern, wie auch die Akkumulation von nukleärem Aktin (vgl. Abb. 19), wobei es sich um weitere Merkmale seneszenter Zellen handelt [145, 147]. Der Nachweis von Seneszenz-spezifischer β-Galaktosidase-Aktivität in den HB9 transduzierten Zellen bestätigte die Beobachtung (vgl. Abb. 18).

Die genannten Beobachtungen zeigen eine deregulierte Organisation des Zytoskeletts, welche sich bereits in der GO-Term Analyse von CD34[HB9], in Form von negativer Anreicherung der Aktin-Zytoskelett-Organisation abzeichnete (vgl. Tab. 17).

Zelluläre Seneszenz ist ein Zustand, in dem sich die Zelle nicht mehr teilen kann, jedoch vital und metabolisch aktiv ist [143]. Der Übergang in die Seneszenz dient als Schutzmechanismus um die Proliferation von Zellen zu unterbinden, die einen irreversiblen DNA-Schaden akkumuliert haben [157]. Physiologisch tritt Seneszenz ein, wenn die Zelle infolge von Telomerverkürzung ihr Replikationslimit erreicht hat (replikative Seneszenz). Infolgedessen ist eine korrekte DNA-Replikation nicht mehr möglich und *DNA-Damage Response* wird initiiert [143, 151]. Es kommt nachfolgend zur Phosphorylierung und Stabilisierung des Zellzyklusregulators p53, wodurch im weiteren Verlauf der Zellzyklus arretiert wird, um den DNA-Schaden zu beheben. Ist der DNA-Schaden irreversibel, wird entweder Apoptose oder Seneszenz eingeleitet, abhängig von der Art des DNA-Schadens, dem Zelltyp, sowie Intensität und Dauer der *DNA-Damage Response* [143].

Setzt die Seneszenz ein bevor die Zelle ihr Replikationslimit erreicht hat, spricht man von prämaturer Seneszenz. Die *DNA-Damage Response* wird in diesem Fall durch oxidativen Stress, DNA-schädigende Agenzien, ionisierende Strahlen oder auch Hyperreplikation ausgelöst [143].

Die durch HB9 induzierte prämature Seneszenz ging in beiden Zellmodellen mit der Akkumulation von p53 einher (vgl. Abb. 20). Der Nachweis der Phosphorylierung von p53 an Serin15 indiziert die Einleitung des p53-Signalweges infolge von *DNA-Damage Response* [150]. p53 induziert nachfolgend die Expression des *Downstream*-Mediators p21, welcher Cyclin-abhängige Kinasen inhibiert und so zum Zellzyklusarrest führt [152, 153]. Basierend darauf konnte in beiden Zellmodellen eine deutliche Anreicherung an p21 beobachtet werden (vgl. Abb. 20). Der siRNA-vermittelte *knockdown* von p53 verhinderte die Ausbildung des HB9-induzierten Zellzyklusarrests und bestätigte so die Abhängigkeit vom p53-Signalweg (vgl. Abb. 22). Da über siRNA jedoch nur ein transienter *knockdown* erzielt werden kann, ließ das Proliferationspotential 96 h nach Transfektion nach. Der Westernblot bestätigte, dass p21 als *Downstream*-Mediator abhängig von p53 reguliert wird. Übereinstimmend damit, hatte die Expression von HB9 in der p53-defizienten AML-Zelllinie HL-60 keinen Einfluss auf die Proliferation (vgl. Abb. 35).

Seneszenz, als Tumor-suppressiver Mechanismus, kann nur durch Stimuli ausgelöst werden, welche in der Lage sind Karzinogenese zu initiieren oder voranzutreiben [155]. So führt die Expression starker Onkogene, beispielsweise *K-Ras*, *B-raf* und *Myc,* zur Induktion von Seneszenz, wenn keine weiteren transformierenden Mutationen vorhanden sind, und wird als *Oncogene-induced senescence* (OIS) bezeichnet [143].

Die Induktion von prämaturer Seneszenz ist daher ein eindeutiger Hinweis auf das onkogene Potential von HB9. Weiterhin zu klären bleibt, wodurch HB9 die Seneszenz induziert, ob infolge von replikativem Stress, oder indirekt durch das Auslösen von oxidativem Stress. Eine Akkumulation aneuploider Zellen (> 4n), wie sie bei Expression von HB9 in NIH3T3 beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 16C), wurde bereits in Folge von replikativem Stress ausgelöst durch MYC beschrieben [175]. MYC überexprimierende Lymphome zeigen im Vergleich zu CD34[HB9] deutliche Übereinstimmungen in den positiv und negativ angereicherten GO-Terms [176]. Positiv angereichert sind GO-Terms assoziiert mit DNA und RNA Prozessierung, sowie Zellzyklus und Mitose, und negativ angereichert sind Phosphorylierung, sowie intrazelluläres *Signaling*. Diese Parallelen in der GO-Term Analyse legen nah, dass HB9 ebenso wie MYC replikativen Stress in der Zelle auslöst.

Die Entstehung von Aneuploidie durch Expression von HB9, wie initial in NIH3T3 beobachtet, konnte in gesteigerter Form in den p53-defizienten HL-60 Zellen detektiert werden, bei denen der Anteil aneuploider Zellen über den Kulturzeitraum zunahm (vgl. Abb. 37). Die Untersuchung stabil mit HB9 transfizierter HL-60 Zellen bestätigte, dass unter Selektionsdruck 100 % der Zellen aneuploid wurden (vgl. Abb. 38). Die Anreicherung aneuploider Zellen zeigt, dass die Expression von HB9 zu genomischer Instabilität führt, potentiell ausgelöst durch replikativen Stress [177]. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass infolge der HB9 Expression sekundäre Mutationen beispielsweise in Genen wie p53 entstehen, wodurch OIS umgangen und die Zelle vollständig transformiert werden kann.

5.3 HB9 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung *in vivo*

In vitro konnte gezeigt werden, dass HB9 das Genexpressionsprofil primärer HSPZ beeinflusst und im Zelllinienmodell prämature Seneszenz sowie genomische Instabilität induziert, wodurch ein onkogenes Potential von HB9 indiziert wird. *In vivo* sollte nun untersucht werden, ob HB9 über die veränderte Genexpression in HSZ die hämatopoetische Differenzierung beeinflusst und das *in vitro* beobachtete onkogene Potential *in vivo* zur Ausbildung einer Neoplasie führt.

Lin^- HSPZ wurden aus $CD45.1^+$ Donor-Mäusen isoliert, mit HB9-GFP oder dem Kontrollvektor lentiviral transduziert, und in myeloablativ bestrahlte Empfängertiere transplantiert.

FACS- und qRT-PCR-Analyse der transduzierten Lin^- Zellen zeigten eine vergleichbare Transduktionsrate sowie GFP-Expression von HB9-GFP und GFP transduzierten Zellen vor Transplantation (vgl. Abb. 24). Eine endogene Expression von HB9 konnte weder in Gesamtknochenmark, noch in Lin^- Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 25) und bestätigt die Ergebnisse in den humanen $CD34^+$ HSPZ. Der Nachweis des Oberflächenmarkers CD45.2 auf allen Blutzellen bestätigte eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems der Empfängertiere aus den transplantierten Zellen (vgl. Abb. 26).

Über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten wurde den Tieren in regelmäßigen Abständen Blut abgenommen und im FACS analysiert, um eine mögliche Leukämieentstehung zu detektieren.

Bei den B6[HB9] Mäusen konnte weder eine Leukozytose, noch eine Anreicherung unreifer Zellen beobachtet werden. Dies zeigte, dass keines der Tiere innerhalb des

Beobachtungszeitraums eine Leukämie entwickelte. Stattdessen konnte bei B6[HB9] Mäusen eine verringerte Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut beobachtet werden (vgl. Abb. 29C). In den Kontrolltieren war die GFP-Expression in jeder Zellreihe nachweisbar, wodurch das multipotente Differenzierungspotential der transduzierten Stammzellen bestätigt wurde (vgl. Abb. 27). In den B6[HB9]-Mäusen konnten GFP-exprimierende Zellen nur innerhalb des Stammzell-/Progenitor-Kompartiments, nicht aber in der reifen Zellpopulation nachgewiesen werden (vgl. Abb. 32). Die Beobachtung, dass HB9-GFP$^+$ HSZ nicht zum maturen Zellpool beitragen, ist eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an hämatopoetischen Zellen im peripheren Blut der B6[HB9] Tiere.

Die Tatsache, dass HB9-GFP$^+$ Zellen im Stammzell-/Progenitorkompartiment jedoch nicht in reifen Zellpopulationen detektiert werden konnten, lässt sich nur durch einen HB9-induzierten Proliferations- oder Differenzierungsarrest erklären. Im Zusammenhang mit den *in-vitro* Daten zu HT1080 und NIH3T3 kann jedoch eher von einem Proliferationsarrest ausgegangen werden. Dennoch zeigten sich Unterschiede in der Verteilung HB9-GFP$^+$ Zellen in lymphoiden und myeloiden Progenitoren. So konnten innerhalb des Progenitorkompartiments bei den B6[HB9] Mäusen deutlich mehr GFP$^+$ Zellen in der myeloiden als der lymphoiden Zellreihe detektiert werden, während bei den B6[GFP] Tieren eine gleichmäßige Verteilung über beide Zellreihen beobachtet wurde (vgl. Abb. 33A). Analog dazu wiesen die B6[HB9] Mäuse geringere Frequenzen an lymphoiden B- und T-Zellen und höhere Frequenzen an Zellen der myeloiden Zellreihe wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten in der Peripherie auf (vgl. Abb. 29A).

Die Unterteilung der myeloiden Progenitoren in CMP, GMP und MEP zeigte bei den B6[HB9] Mäusen eine signifikante Anreicherung GFP$^+$ Zellen im MEP Kompartiment verglichen zu den anderen beiden Kompartimenten (vgl. Abb. 33D). Aus dem MEP Kompartiment entstehen im weiteren Verlauf der Differenzierung Thrombozyten und Erythrozyten. Bei beiden Zelltypen handelt es sich um anukleäre Zellen, die somit nicht zur GFP-Expression fähig sind und in der FACS-Analyse nicht berücksichtigt werden konnten, so dass zu der Ausreifung HB9 exprimierender MEPs keine Aussage gemacht werden kann.

Die signifikante Anreicherung HB9-GFP$^+$ Zellen im MEP Kompartiment spiegelt die *de novo* Expression Erythropoese-assoziierter Gene wieder, die in der RNAseq Analyse von CD34[HB9] detektiert wurde (vgl. Tab. 16).

Die präferentielle Differenzierung HB9-exprimierender HSZ in die myeloide Zellreihe im Mausmodell ist kongruent zu dem exklusiven Auftreten der Translokation t(7;12) in myeloischer Leukämie [75]. Aufgrund ihres Differenzierungsgrades werden die Blasten der

Patienten zumeist einem sehr undifferenzierten Stadium zugeordnet (FAB M0-M2), es gibt jedoch auch Patienten die mit erythroblastärer (FAB M6; [77, 79]) oder megakaryoblastärer (FAB M7; [73, 102]) Leukämie eingestuft werden. Des Weiteren wurden bei Translokation t(7;12)-positiven Patienten signifikant höhere Thrombozytenzahlen im Vergleich zu Translokation t(7;12)-negativen AML-Patienten detektiert [75], welche in Relation zu den Ergebnissen im Mausmodell ebenfalls als präferentielle Differenzierung in die megakaryozytäre Zellreihe angesehen werden könnten.

Die Präferenz zur Bildung von Zellen der myeloiden Zellreihe ist ein Kennzeichen eines gealterten hämatopoetischen Systems [178]. HSZ, isoliert aus älteren Mäusen, weisen ein geringeres Potential auf lymphoide Progenitoren zu bilden als HSZ, isoliert aus jungen Mäusen, verfügen jedoch über ein gleichbleibendes oder sogar gesteigertes Potential zur Bildung myeloider Zellen. Dies geht mit einer ansteigenden Inzidenz von myeloiden Erkrankungen im Alter, wie Myelodysplastischem Syndrom oder akuten und chronischen myeloischen Leukämien einher, während im Kindesalter lymphoide Leukämien dominieren [178, 179].

Die für $HB9^+$ HSZ beobachtete Präferenz zur Differenzierung in die myeloide Zellreihe könnte das Ergebnis replikativer Seneszenz sein, wie sie *in vitro* gezeigt wurde, und mit der myeloiden Tendenz physiologisch gealterter HSZ korrelieren.

5.4 Evaluation neuer Wirkstoffe zur Behandlung HB9 exprimierender AML

Die Prognose für AML-Patienten mit Translokation t(7;12) und einhergehender Expression von HB9 ist sehr schlecht, nur 0-28 % überleben die ersten fünf Jahre nach Diagnose [75-78].

Die Behandlung der Patienten erfolgt gemäß standardisierten Protokollen. Eine zielgerichtete Behandlung, wie sie beispielsweise für Patienten mit Translokation t(15;17)-*PML-RARα* in Form von ATRA zur Verfügung steht, und in Kombination mit Chemotherapie zur Langzeitremission führt [68], besteht nicht. Daher ist es von großem Interesse HB9-spezifische Therapieoptionen zu ermitteln, die bei der Behandlung Translokation t(7;12)-positiver AML-Patienten Anwendung finden könnten.

5.4.1 HB9$^+$ Zellen zeigen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber ATRA

Bei Patienten mit Translokation t(15;17)-*PML-RARα* führt die Behandlung mit ATRA zur Differenzierung und infolgedessen zur Apoptose der Blasten [66, 67]. ATRA bindet an Retinsäurerezeptoren und initiiert so die Transkription von Genen, deren Promotoren Retinsäure-abhängige Bindestellen (RAREs) beinhalten. In myeloiden Vorläuferzellen kann so die terminale myeloide Ausdifferenzierung der Zellen induziert werden [133].

Genexpressionsstudien zeigten, dass Translokation t(15;17) und Translokation t(7;12)-positive Patienten hinsichtlich ihres Expressionsprofils gruppieren [162], wodurch die Frage aufkommt, ob auch Translokation t(7;12)-positive Patienten mit ektoper HB9-Expression von einer Behandlung durch ATRA profitieren könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HL60[HB9] Zellen infolge der Behandlung mit ATRA ein gesteigertes Differenzierungspotential im Vergleich zu HL60[GFP] aufweisen (vgl. Abb. 40). Einhergehend mit dem gesteigerten Differenzierungspotential, zeigten HL60[HB9] Zellen auch eine gesteigerte Apoptoserate. Zudem war die Apoptose-Induktion in HL60[HB9] bereits bei einer geringeren ATRA-Konzentration als in HL60[GFP] nachweisbar (vgl. Abb. 42).

Zellzyklusanalysen zeigten, dass die Behandlung mit ATRA in HL60[HB9] und HL60[GFP] zu einer Reduktion der Zellen in der G2/M-Phase führte (vgl. Abb. 41). Dies stimmt überein mit Studien, die belegen, dass die ATRA-induzierte Differenzierung mit einem G1-Arrest einhergeht [180].

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass HL-60 Zellen infolge der Expression von HB9 deutlich sensitiver auf die ATRA-induzierte Differenzierung reagieren und zudem verstärkt in die Apoptose übergehen.

Ein Zusammenhang zwischen HB9 Expression und dem Retinsäuresignalweg wurde bereits in der Pankreasentwicklung beschrieben. Studien an Retinsäure-defizienten Mäusen zeigten eine signifikant reduzierte Frequenz an HB9 exprimierenden endodermalen Zellen im Pankreas [181]. Die Interaktion von HB9 und dem Retinsäuresignalweg wurde im Zebrafischmodel bestätigt. Während die Stimulation des Retinsäuresignalwegs zu einer höheren Frequenz an HB9 exprimierenden endodermalen Zellen führte, bewirkte die Blockierung des Signalwegs einen gegenteiligen Effekt. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen konnten RAREs im HB9 Promotor identifiziert werden [98].

Genexpressionsanalysen in ATRA-behandelten HB9$^+$ Zellen sind notwendig, um Aufschluss darüber zu geben wie HB9 die ATRA-induzierte Differenzierungsantwort verstärkt, bevor

ATRA als mögliche neue Therapieoption für Patienten mit Translokation t(7;12) und ektoper Expression von HB9 in Erwägung gezogen werden kann.

5.4.2 ABT-199 ist ein möglicher Kandidat zur Behandlung HB9$^+$ AML

Um weitere Therapieoptionen in Bezug auf eine Expression von HB9 bei Translokation t(7;12)-positiver AML zu evaluieren, wurden HL60[HB9] und HL60[GFP] Zellen in einem Viabilitätsassay auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Wirkstoffen untersucht. Hierfür wurden bekannte Kinase-Inhibitoren, wie auch Wirkstoffe, die in der Krebstherapie oder in späten klinischen Studien Anwendung finden, verwendet.
Als potenter Kandidat konnte ABT-199 identifiziert werden. HL60[HB9] Zellen wiesen mit 6,6 nM einen um mehr als die Hälfte geringeren IC_{50} als HL60[GFP] mit 14,6 nM auf (vgl. Abb. 43).
ABT-199 ist unter dem Namen Venclexta in den USA für die Therapie rezidivierter oder refraktärer chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) mit Deletion 17p zugelassen und wird aktuell in Studien zur Behandlung von AML untersucht [182]. Die für HL60[HB9] und HL60[GFP] gemessenen IC_{50}-Werte liegen im therapeutisch angewandten Konzentrationsbereich von ABT-199 für die Behandlung von CLL.
ABT-199 inhibiert selektiv das *B-cell lymphoma 2* Protein (BCL-2) [163]. BCL-2 ist ein Vertreter und zugleich Namensgeber der BCL-2 Proteinfamilie, zu deren Mitgliedern sowohl anti- als auch pro-apoptotische Proteine gehören, welche die Apoptose regulieren [164]. BCL-2 gehört zu den anti-apoptotischen Proteinen und ist in CLL und B-Zell-Lymphomen überexprimiert, wodurch die Apoptose der Blasten inhibiert wird [183].
Westernblot Analysen ergaben, dass die Expression von BCL-2 in HL60[HB9] nicht gesteigert, sondern signifikant verringert war verglichen zur Kontrolle (vgl. Abb. 44). Die verringerte Menge an BCL-2 in HL60[HB9] erklärt, warum diese sensitiver gegenüber dem Inhibitor sind. Ursache der verringerten BCL-2 Expression in HL60[HB9] könnte die durch HB9 verringerte Expression von EP2 sein (vgl. Abb. 45) [104]. Studien in HL-60 Zellen zeigten, dass autokrines PGE2/EP2 Rezeptor *Signaling* eine Apoptose der Zellen infolge von oxidativem Stress verhindert und gleichzeitig die Expression von BCL-2 induziert [184, 185]. Demzufolge könnte eine negative Regulation des autokrinen PGE2-*Signalings* infolge der durch HB9 verringerten EP2-Expression ursächlich für die reduzierte BCL-2 Menge in HL60[HB9] sein.

Weitere Studien zur Untersuchung des Einflusses von ABT-199 auf Proliferation, Zellzyklus und Apoptose in HL60[HB9] sind notwendig, um den Zusammenhang von HB9 Expression und Sensitivität gegenüber ABT-199 näher zu beleuchten.

5.5 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung einer Expression von HB9 in primären hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen und deren Einfluss auf die Entstehung einer myeloiden Leukämie zu definieren.

Die Expression von HB9 in humanen $CD34^+$ HSPZ führte zu einer Anreicherung Zellzyklus-assoziierter biologischer Prozesse, insbesondere von Mitose, sowie zu einer Reduktion von G-Protein/cAMP-vermitteltem *Signaling*. In Zusammenhang damit konnte die initial im HL-60 Zellmodell beschriebene negative Regulation von *PTGER2* durch HB9 in primären HSPZ validiert werden. Zudem konnte *HPGD* als ein weiteres Zielgen von HB9 im PGE2-Signalweg identifiziert werden. Untersuchungen zum Einfluss von HB9 auf Proliferation und Zellzyklus, basierend auf den angereicherten GO-Terms, zeigten, dass die Expression von HB9 eine p53/p21-abhängige *DNA Damage Response* induziert und in Folge dessen zum Proliferationsarrest der Zelle und prämaturer Seneszenz führt. In p53-defizienten HL-60 Zellen steigerte HB9 die genomische Instabilität und resultierte in Aneuploidie.

Dies und das Auslösen von prämaturer Seneszenz als Tumor-suppressivem Mechanismus sind eindeutige Hinweise auf das onkogene Potential von HB9.

Nach Transplantation von HB9-GFP^+ Lin^- HSPZ konnten HB9-GFP^+ Zellen *in vivo* nur im Stammzell-/Progenitorkompartiment nicht aber im maturen Zellpool detektiert werden. Ob es sich hierbei um einen Differenzierungs- oder einen Proliferationsarrest handelte konnte im vorliegenden Modell nicht abschließend geklärt werden, die *in vitro* Daten legen jedoch einen Proliferationsarrest nahe. Innerhalb des Progenitorkompartiments ließen sich HB9-GFP^+ Zellen verstärkt in myeloiden Vorläuferzellen nachweisen. Die präferentielle Differenzierung in die myeloide Zellreihe ist kennzeichnend für ein gealtertes hämatopoetisches System und steht in Zusammenhang mit dem Auftreten altersbedingter myeloider Neoplasien [179]. Basierend darauf ergibt sich die Hypothese, dass HB9 über replikativen Stress zu einer vorzeitigen Zellalterung der HSZ führt und analog zum physiologisch gealterten hämatopoetischen System die Entstehung einer AML begünstigt.

Mit ATRA und ABT-199 konnten bereits zwei mögliche Kandidaten für eine gerichtete Therapie HB9-exprimierender AML identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie bilden die Basis für zukünftige Untersuchungen zur HB9-gerichteten Therapie und somit möglicher Ansätze zur Behandlung Translokation $t(7;12)^+$ AML Patienten.

6 Literaturverzeichnis

1. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology.* Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
2. Yahata, T., et al., *Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis.* Stem Cells, 2008. **26**(12): p. 3228-36.
3. Giebel, B. and I. Bruns, *Self-renewal versus differentiation in hematopoietic stem and progenitor cells: a focus on asymmetric cell divisions.* Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(1): p. 9-16.
4. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.* Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
5. Morrison, S.J., et al., *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors.* Development, 1997. **124**(10): p. 1929-39.
6. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.* Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
7. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.* Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
8. Traver, D., et al., *Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor.* Science, 2000. **290**(5499): p. 2152-4.
9. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors.* Blood, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
10. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway's immunobiology*. Vol. 7. 2008: Garland Science.
11. Domen, J. and I.L. Weissman, *Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate.* Mol Med Today, 1999. **5**(5): p. 201-8.
12. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.* Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
13. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 35-71.
14. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.* Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
15. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.* Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
16. Ara, T., et al., *Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny.* Immunity, 2003. **19**(2): p. 257-67.
17. Hofer, T. and H.R. Rodewald, *Output without input: the lifelong productivity of hematopoietic stem cells.* Curr Opin Cell Biol, 2016. **43**: p. 69-77.
18. Lane, S.W. and D.G. Gilliland, *Leukemia stem cells.* Semin Cancer Biol, 2010. **20**(2): p. 71-6.
19. Pietras, E.M., M.R. Warr, and E. Passegue, *Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells.* J Cell Biol, 2011. **195**(5): p. 709-20.
20. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells.* Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
21. Lilly, A.J., W.E. Johnson, and C.M. Bunce, *The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour.* Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 274564.
22. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.* Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
23. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells.* Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
24. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells.* Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
25. Lo Celso, C. and D.T. Scadden, *The haematopoietic stem cell niche at a glance.* J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 21): p. 3529-35.

26. Kaatsch, P., Spix, C., *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014)*. 2015: Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
27. Howlader, N., Noone, AM., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, SF., Kosary, CL., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, DR., Chen, HS., Feuer, EJ., Cronin, KA., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013*. 2016: National Cancer Institute. Bethesda, MD.
28. Ward, E., et al., *Childhood and adolescent cancer statistics, 2014.* CA Cancer J Clin, 2014. **64**(2): p. 83-103.
29. Belson, M., B. Kingsley, and A. Holmes, *Risk factors for acute leukemia in children: a review.* Environ Health Perspect, 2007. **115**(1): p. 138-45.
30. Seif, A.E., *Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis.* Cancer Genet, 2011. **204**(5): p. 227-44.
31. Sander, A., et al., *Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials.* Leukemia, 2010. **24**(8): p. 1422-8.
32. Taga, T., et al., *Acute myeloid leukemia in children: Current status and future directions.* Pediatr Int, 2016. **58**(2): p. 71-80.
33. Roboz, G.J. and M. Guzman, *Acute myeloid leukemia stem cells: seek and destroy.* Expert Rev Hematol, 2009. **2**(6): p. 663-72.
34. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
35. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay.* J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
36. Bruce, W.R. and H. Van Der Gaag, *A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO.* Nature, 1963. **199**: p. 79-80.
37. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.* Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
38. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.* Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
39. Ishikawa, F., et al., *Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1315-21.
40. Tavor, S., et al., *CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice.* Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2817-24.
41. Zeng, Z., et al., *Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML.* Blood, 2009. **113**(24): p. 6215-24.
42. Zon, L.I., *Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal.* Nature, 2008. **453**(7193): p. 306-13.
43. Wang, Y., et al., *The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML.* Science, 2010. **327**(5973): p. 1650-3.
44. Zhao, C., et al., *Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia.* Nature, 2009. **458**(7239): p. 776-9.
45. Guzman, M.L., et al., *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells.* Blood, 2001. **98**(8): p. 2301-7.
46. Guzman, M.L., et al., *The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4163-9.
47. Reed, J.C., *Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects.* Blood, 2008. **111**(7): p. 3322-30.
48. Kang, M.H. and C.P. Reynolds, *Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1126-32.
49. Majeti, R., *Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells.* Oncogene, 2011. **30**(9): p. 1009-19.

50. Lamb, J., et al., *The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease.* Science, 2006. **313**(5795): p. 1929-35.
51. Hassane, D.C., et al., *Discovery of agents that eradicate leukemia stem cells using an in silico screen of public gene expression data.* Blood, 2008. **111**(12): p. 5654-62.
52. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
53. Kelly, L.M. and D.G. Gilliland, *Genetics of myeloid leukemias.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002. **3**: p. 179-98.
54. Schulz, W., *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*. 2005: Springer Netherlands.
55. Boxer, L.M. and C.V. Dang, *Translocations involving c-myc and c-myc function.* Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5595-610.
56. Lo-Coco, F. and S.K. Hasan, *Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia.* Best Pract Res Clin Haematol, 2014. **27**(1): p. 3-9.
57. Pui, C.H., et al., *Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update.* J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 551-65.
58. Paschka, P., *Core binding factor acute myeloid leukemia.* Semin Oncol, 2008. **35**(4): p. 410-7.
59. Marschalek, R., *Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins.* Br J Haematol, 2011. **152**(2): p. 141-54.
60. Creutzig, U., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel.* Blood, 2012. **120**(16): p. 3187-205.
61. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
62. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.* Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
63. Rubnitz, J.E., et al., *Characteristics and outcome of t(8;21)-positive childhood acute myeloid leukemia: a single institution's experience.* Leukemia, 2002. **16**(10): p. 2072-7.
64. Balgobind, B.V., et al., *Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study.* Blood, 2009. **114**(12): p. 2489-96.
65. Coenen, E.A., et al., *Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study.* Blood, 2011. **117**(26): p. 7102-11.
66. Bapna, A., et al., *All-trans-retinoic acid (ATRA): pediatric acute promyelocytic leukemia.* Pediatr Hematol Oncol, 1998. **15**(3): p. 243-8.
67. Tallman, M.S., et al., *All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia.* N Engl J Med, 1997. **337**(15): p. 1021-8.
68. Tallman, M.S., et al., *All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4298-302.
69. Wheatley, K., et al., *A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties.* Br J Haematol, 1999. **107**(1): p. 69-79.
70. Raimondi, S.C., et al., *Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821.* Blood, 1999. **94**(11): p. 3707-16.
71. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.* Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
72. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia.* Blood Rev, 2004. **18**(2): p. 115-36.

73. Slater, R.M., et al., *t(7;12)(q36;p13) and t(7;12)(q32;p13)--translocations involving ETV6 in children 18 months of age or younger with myeloid disorders.* Leukemia, 2001. **15**(6): p. 915-20.
74. Masetti, R., et al., *Acute myeloid leukemia in infants: biology and treatment.* Front Pediatr, 2015. **3**: p. 37.
75. von Bergh, A.R., et al., *High incidence of t(7;12)(q36;p13) in infant AML but not in infant ALL, with a dismal outcome and ectopic expression of HLXB9.* Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(8): p. 731-9.
76. Simmons, H.M., et al., *Cytogenetic and molecular heterogeneity of 7q36/12p13 rearrangements in childhood AML.* Leukemia, 2002. **16**(12): p. 2408-16.
77. Satake, N., et al., *Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants.* Leukemia, 1999. **13**(7): p. 1013-7.
78. Park, J., et al., *Three-way complex translocations in infant acute myeloid leukemia with t(7;12)(q36;p13): the incidence and correlation of a HLXB9 overexpression.* Cancer Genet Cytogenet, 2009. **191**(2): p. 102-5.
79. Tosi, S., et al., *t(7;12)(q36;p13), a new recurrent translocation involving ETV6 in infant leukemia.* Genes Chromosomes Cancer, 2000. **29**(4): p. 325-32.
80. Naiel, A., et al., *A Novel Three-Colour Fluorescence in Situ Hybridization Approach for the Detection of t(7;12)(q36;p13) in Acute Myeloid Leukaemia Reveals New Cryptic Three Way Translocation t(7;12;16).* Cancers (Basel), 2013. **5**(1): p. 281-95.
81. Tosi, S., et al., *Heterogeneity of the 7q36 breakpoints in the t(7;12) involving ETV6 in infant leukemia.* Genes Chromosomes Cancer, 2003. **38**(2): p. 191-200.
82. Beverloo, H.B., et al., *Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13).* Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5374-7.
83. Cave, H., et al., *ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia.* Leukemia, 1997. **11**(9): p. 1459-64.
84. Cools, J., et al., *Evidence for position effects as a variant ETV6-mediated leukemogenic mechanism in myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13) or t(5;12)(q31;p13).* Blood, 2002. **99**(5): p. 1776-84.
85. Tosi, S., et al., *Paediatric acute myeloid leukaemia with the t(7;12)(q36;p13) rearrangement: a review of the biological and clinical management aspects.* Biomark Res, 2015. **3**: p. 21.
86. Rawat, V.P., et al., *Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 817-22.
87. Gehring, W.J., M. Affolter, and T. Burglin, *Homeodomain proteins.* Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 487-526.
88. Holland, P.W., H.A. Booth, and E.A. Bruford, *Classification and nomenclature of all human homeobox genes.* BMC Biol, 2007. **5**: p. 47.
89. Deguchi, Y. and J.H. Kehrl, *Nucleotide sequence of a novel diverged human homeobox gene encodes a DNA binding protein.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(13): p. 3742.
90. Harrison, K.A., et al., *A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues.* J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19968-75.
91. Saha, M.S., R.R. Miles, and R.M. Grainger, *Dorsal-ventral patterning during neural induction in Xenopus: assessment of spinal cord regionalization with xHB9, a marker for the motor neuron region.* Dev Biol, 1997. **187**(2): p. 209-23.
92. Tanabe, Y., C. William, and T.M. Jessell, *Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein.* Cell, 1998. **95**(1): p. 67-80.
93. Harrison, K.A., et al., *Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice.* Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 71-5.
94. Reddy Chichili, V.P., V. Kumar, and J. Sivaraman, *Linkers in the structural biology of protein-protein interactions.* Protein Sci, 2013. **22**(2): p. 153-67.
95. Katan-Khaykovich, Y. and Y. Shaul, *Nuclear import and DNA-binding activity of RFX1. Evidence for an autoinhibitory mechanism.* Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 3108-16.

96. Desai, S.S., et al., *GSK-3beta protein phosphorylates and stabilizes HLXB9 protein in insulinoma cells to form a targetable mechanism of controlling insulinoma cell proliferation.* J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 5386-98.
97. Li, H., et al., *Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9.* Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 67-70.
98. Dalgin, G., et al., *Zebrafish mnx1 controls cell fate choice in the developing endocrine pancreas.* Development, 2011. **138**(21): p. 4597-608.
99. Li, H. and H. Edlund, *Persistent expression of Hlxb9 in the pancreatic epithelium impairs pancreatic development.* Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 247-53.
100. Thaler, J., et al., *Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9.* Neuron, 1999. **23**(4): p. 675-87.
101. Arber, S., et al., *Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity.* Neuron, 1999. **23**(4): p. 659-74.
102. Taketani, T., et al., *MNX1-ETV6 fusion gene in an acute megakaryoblastic leukemia and expression of the MNX1 gene in leukemia and normal B cell lines.* Cancer Genet Cytogenet, 2008. **186**(2): p. 115-9.
103. Deguchi, Y. and J.H. Kehrl, *Selective expression of two homeobox genes in CD34-positive cells from human bone marrow.* Blood, 1991. **78**(2): p. 323-8.
104. Wildenhain, S., et al., *Homeobox protein HB9 binds to the prostaglandin E receptor 2 promoter and inhibits intracellular cAMP mobilization in leukemic cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(48): p. 40703-12.
105. Nagel, S., et al., *Activation of HLXB9 by juxtaposition with MYB via formation of t(6;7)(q23;q36) in an AML-M4 cell line (GDM-1).* Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(2): p. 170-8.
106. Cretolle, C., et al., *Spectrum of HLXB9 gene mutations in Currarino syndrome and genotype-phenotype correlation.* Hum Mutat, 2008. **29**(7): p. 903-10.
107. Ross, A.J., et al., *A homeobox gene, HLXB9, is the major locus for dominantly inherited sacral agenesis.* Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 358-61.
108. Bonnefond, A., et al., *Transcription factor gene MNX1 is a novel cause of permanent neonatal diabetes in a consanguineous family.* Diabetes Metab, 2013. **39**(3): p. 276-80.
109. Flanagan, S.E., et al., *Analysis of transcription factors key for mouse pancreatic development establishes NKX2-2 and MNX1 mutations as causes of neonatal diabetes in man.* Cell Metab, 2014. **19**(1): p. 146-54.
110. Desai, S.S., et al., *Pro-oncogenic Roles of HLXB9 Protein in Insulinoma Cells through Interaction with Nono Protein and Down-regulation of the c-Met Inhibitor Cblb (Casitas B-lineage Lymphoma b).* J Biol Chem, 2015. **290**(42): p. 25595-608.
111. Wilkens, L., et al., *The homeobox gene HLXB9 is upregulated in a morphological subset of poorly differentiated hepatocellular carcinoma.* Virchows Arch, 2011. **458**(6): p. 697-708.
112. Hollington, P., et al., *Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues.* Anticancer Res, 2004. **24**(2b): p. 955-62.
113. Ferguson, S., H.E. Gautrey, and G. Strathdee, *The dual role of HLXB9 in leukemia.* Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(3): p. 349-52.
114. Wildenhain, S., et al., *Expression of cell-cell interacting genes distinguishes HLXB9/TEL from MLL-positive childhood acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2010. **24**(9): p. 1657-60.
115. Hata, A.N. and R.M. Breyer, *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.* Pharmacol Ther, 2004. **103**(2): p. 147-66.
116. Regan, J.W., *EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling.* Life Sci, 2003. **74**(2-3): p. 143-53.
117. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
118. Bergmans, H.E., I.M. van Die, and W.P. Hoekstra, *Transformation in Escherichia coli: stages in the process.* J Bacteriol, 1981. **146**(2): p. 564-70.

119. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
120. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.* Nature, 1977. **265**(5596): p. 687-95.
121. Alcaraz, C., et al., *Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus.* J Vet Diagn Invest, 1990. **2**(3): p. 191-6.
122. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
123. Lin, Z., et al., *In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells.* Nat Protoc, 2014. **9**(7): p. 1563-77.
124. Piacibello, W., et al., *Lentiviral gene transfer and ex vivo expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4391-400.
125. Vigna, E. and L. Naldini, *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy.* J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 308-16.
126. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
127. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.* J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
128. Reed, S.E., et al., *Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors.* J Virol Methods, 2006. **138**(1-2): p. 85-98.
129. Davis, H.E., J.R. Morgan, and M.L. Yarmush, *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes.* Biophys Chem, 2002. **97**(2-3): p. 159-72.
130. Moritz, T., et al., *Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments.* Blood, 1996. **88**(3): p. 855-62.
131. O'Doherty, U., W.J. Swiggard, and M.H. Malim, *Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding.* J Virol, 2000. **74**(21): p. 10074-80.
132. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.* J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
133. Barber, N., L. Belov, and R.I. Christopherson, *All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias.* Leuk Res, 2008. **32**(2): p. 315-22.
134. Breitman, T.R., S.E. Selonick, and S.J. Collins, *Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2936-40.
135. Osborn, M.J., et al., *A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system.* Mol Ther, 2005. **12**(3): p. 569-74.
136. Salmon, P., et al., *High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors.* Blood, 2000. **96**(10): p. 3392-8.
137. Ishikawa, F., et al., *Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+ CD38.* Leukemia, 2003. **17**(5): p. 960-4.
138. Matsumoto, T. and H. Mugishima, *Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood.* Int J Stem Cells, 2009. **2**(2): p. 83-9.
139. Byun, H.S., et al., *Thioredoxin overexpression in HT-1080 cells induced cellular senescence and sensitization to gamma radiation.* FEBS Lett, 2005. **579**(19): p. 4055-62.

140. Rao, W., et al., *OVA66, a tumor associated protein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 cells.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e85705.
141. Hackenbeck, T., et al., *HIF-1 or HIF-2 induction is sufficient to achieve cell cycle arrest in NIH3T3 mouse fibroblasts independent from hypoxia.* Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1386-95.
142. Cristofalo, V.J. and R.J. Pignolo, *Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture.* Physiol Rev, 1993. **73**(3): p. 617-38.
143. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence.* Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
144. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
145. Nishio, K. and A. Inoue, *Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts.* Histochem Cell Biol, 2005. **123**(3): p. 263-73.
146. Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen, *Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 8): p. 1855-64.
147. Lim, I.K., et al., *Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts.* Mech Ageing Dev, 2000. **119**(3): p. 113-30.
148. Kwak, I.H., et al., *Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker.* Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 572-80.
149. Wada, A., et al., *Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein.* Embo j, 1998. **17**(6): p. 1635-41.
150. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.* Cell, 1997. **91**(3): p. 325-34.
151. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.* Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
152. Jackson, J.G. and O.M. Pereira-Smith, *p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts.* Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8356-60.
153. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.* Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
154. Baldwin, E.L. and N. Osheroff, *Etoposide, topoisomerase II and cancer.* Curr Med Chem Anticancer Agents, 2005. **5**(4): p. 363-72.
155. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence.* J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
156. Courtois-Cox, S., S.L. Jones, and K. Cichowski, *Many roads lead to oncogene-induced senescence.* Oncogene, 2008. **27**(20): p. 2801-9.
157. Prieur, A. and D.S. Peeper, *Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis.* Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 150-5.
158. Gallagher, R., et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.* Blood, 1979. **54**(3): p. 713-33.
159. Dalton, W.T., Jr., et al., *HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3.* Blood, 1988. **71**(1): p. 242-7.
160. Amann, P.M., et al., *Regulation of gene expression by retinoids.* Curr Med Chem, 2011. **18**(9): p. 1405-12.
161. Castaigne, S., et al., *All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results.* Blood, 1990. **76**(9): p. 1704-9.
162. Balgobind, B.V., et al., *Evaluation of gene expression signatures predictive of cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia.* Haematologica, 2011. **96**(2): p. 221-30.
163. Souers, A.J., et al., *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets.* Nat Med, 2013. **19**(2): p. 202-8.
164. Yip, K.W. and J.C. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6398-406.

165. Kunda, P. and B. Baum, *The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning.* Trends Cell Biol, 2009. **19**(4): p. 174-9.
166. Straight, A.F. and C.M. Field, *Microtubules, membranes and cytokinesis.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R760-70.
167. Kaidi, A., et al., *Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia.* Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6683-91.
168. Legler, D.F., et al., *Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(2): p. 198-201.
169. North, T.E., et al., *Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis.* Nature, 2007. **447**(7147): p. 1007-11.
170. Hoggatt, J., et al., *Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation.* Blood, 2009. **113**(22): p. 5444-55.
171. Ikushima, Y.M., et al., *Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells.* Blood, 2013. **121**(11): p. 1995-2007.
172. Tai, H.H., *Prostaglandin catabolic enzymes as tumor suppressors.* Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(3-4): p. 409-17.
173. Baratelli, F., et al., *Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells.* J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1483-90.
174. Ahmadi, M., D.C. Emery, and D.J. Morgan, *Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo.* Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7520-9.
175. Felsher, D.W., et al., *Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10544-8.
176. Sabo, A., et al., *Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis.* Nature, 2014. **511**(7510): p. 488-92.
177. Gelot, C., I. Magdalou, and B.S. Lopez, *Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis.* Genes (Basel), 2015. **6**(2): p. 267-98.
178. Rossi, D.J., C.H. Jamieson, and I.L. Weissman, *Stems cells and the pathways to aging and cancer.* Cell, 2008. **132**(4): p. 681-96.
179. Akunuru, S. and H. Geiger, *Aging, Clonality, and Rejuvenation of Hematopoietic Stem Cells.* Trends Mol Med, 2016. **22**(8): p. 701-12.
180. Drayson, M.T., et al., *Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid.* Exp Cell Res, 2001. **266**(1): p. 126-34.
181. Martin, M., et al., *Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice.* Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 399-411.
182. Cang, S., et al., *ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development.* J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 129.
183. Packham, G. and F.K. Stevenson, *Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia.* Immunology, 2005. **114**(4): p. 441-9.
184. Yeo, H.S., A. Shehzad, and Y.S. Lee, *Prostaglandin E2 blocks menadione-induced apoptosis through the Ras/Raf/Erk signaling pathway in promonocytic leukemia cell lines.* Mol Cells, 2012. **33**(4): p. 371-8.
185. Shehzad, A., J. Lee, and Y.S. Lee, *Autocrine prostaglandin E(2) signaling promotes promonocytic leukemia cell survival via COX-2 expression and MAPK pathway.* BMB Rep, 2015. **48**(2): p. 109-14.
186. Rio, D.C., S.G. Clark, and R. Tjian, *A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction.* Science, 1985. **227**(4682): p. 23-8.
187. Rasheed, S., et al., *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080).* Cancer, 1974. **33**(4): p. 1027-33.

188. Aaronson, S.A. and G.J. Todaro, *Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40.* J Cell Physiol, 1968. **72**(2): p. 141-8.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Verwendete Mausstämme

In dieser Arbeit wurden Tiere der Mausstämme C57BL/6J ($CD45.2^+$), sowie B6.SJL-Ptprc Pepc/BoyJ ($CD45.1^+$) verwendet. B6.SJL-Ptprc Pepc/BoyJ Mäuse entstammten der hausinternen Zucht der "Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben“ (ZETT) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. C57BL/6J Mäuse wurden von JANVIER LABS bezogen. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des "Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV)" durchgeführt.

7.1.2 Nabelschnurblut

Das für die Gewinnung von $CD34^+$ HSPZ verwendete Nabelschnurblut entstammte der José Carreras Stammzellbank (Universitätsklinikum Düsseldorf) und wurde freundlicherweise von Fr. Prof. Dr. Kögler zur Verfügung gestellt. Ein Ethikvotum lag vor.

7.1.3 Verwendete Zelllinien

Name	Ref.-Nr.	Zelltyp/Ursprungsgewebe	Erstbeschreibung
293T	ACC 635	embryonale Niere	[186]
HL-60	ACC 3	akute myeloische Leukämie	[158]
HL-60_Mock-Puro			[104]
HL-60_HB9-Puro			[104]
HT1080	ACC 315	Fibrosarkom	[187]
NIH-3T3	ACC 59	embryonale Fibroblasten	[188]

7.1.4 Bakterien

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden E. coli „Top10-DH10ß“ (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

7.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) in *pro analysi* Qualität bezogen.

7.1.6 Pro- und eukaryotische Nährmedien

Alle Plastikverbrauchsmaterialien, die für die Zell- oder Bakterienkultur verwendet wurden, stammten von den Firmen Corning Costar (Bodenheim), BD Falcon (Heidelberg), Nalgene Labware (Rochester, NY, USA) oder Greiner Bio-One (Solingen).

Für die Bakterienkultur wurde LB-Medium (Lennox) und LB-Agar (Lennox) der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet, sowie Ampicillin und Spectinomycin der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Zellkulturmedien oder -zusätze	Firma
DMEM + GlutaMAX	GIBCO (Darmstadt)
RPMI 1640	GIBCO (Darmstadt)
L-Glutamin 200 mM	GIBCO (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin 100x (P/S)	GIBCO (Darmstadt)
Trypsin/EDTA 1x	GIBCO (Darmstadt)
StemSpan SFEM	Stemcell Technologies (Köln)
X-Vivo 20	Lonza (Köln)
Dulbecco´s PBS 1x	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FKS (fötales Kälberserum)	PAA (Pasching, Östereich)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MACS-Puffer	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Polyethylenimine Transfektionsreagenz (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hexadimethrinbromid (Polybrene)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RetroNectin	TaKaRa (Frankfurt a. M.)
DharmaFect 4	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
Zytokine	Peprotech (Hamburg)
Türk´s Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumchlorid zur Erythrozytenlyse	Apotheke Uniklinikum Düsseldorf
All-trans Retinsäure (ATRA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Etoposid	Cell Signaling (Cambridge, UK)

7.1.7 Plasmide

Zur Herstellung eines lentiviralen HB9-Expressionskonstruktes wurde die kodierende Sequenz von HB9 (NM_005515; CDS 304-1509) von der Firma GeneArt bezogen, das Stoppcodon deletiert und die Sequenz in den lentiviralen Expressionsvektor pCDH-EF1-MCS-T2A-GFP (SBI, Palo Alto, CA, USA) kloniert (Abb. 46). Der Vektor basiert auf einem bicistronischen Expressionssystem, so dass sich die Gensequenzen für HB9 und GFP auf einem Transkript befinden, ausgehend von dem EF1-Promotor. Durch die Verwendung einer 2A-Site findet die Separation von HB9 und GFP erst bei der Translation statt. Bei der 2A-Site handelt es sich um eine Peptidsequenz, die dazu führt, dass das Ribosom die Synthese einer Peptidbindung am C-terminalen Ende des 2A-Elementes auslässt, so dass die Peptidsequenzen *upstream* und *downstream* der 2A-Site voneinander separiert werden [135]. Der Elongation factor-1α (EF1) Promotor kann im Gegensatz zu anderen Promotoren nicht epigenetisch inaktiviert werden und erzeugt eine physiologische Expressionsstärke in hämatopoetischen Zellen [136]. Als Negativkontrolle für die Experimente wurde der GFP-Leervektor verwendet.
Die Helferplasmide (vgl. Tab. 15) zur Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel waren im Labor vorhanden [127].

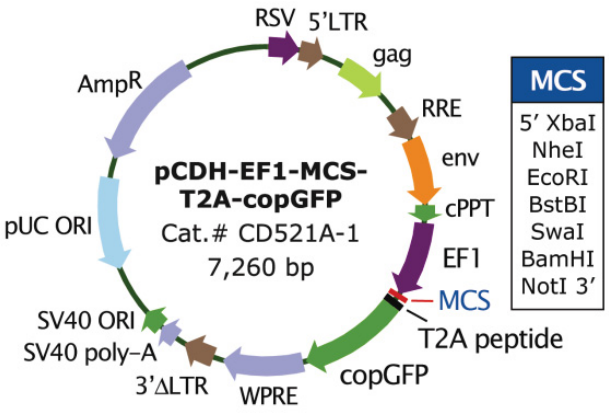

Abb. 46: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pCDH-EF1-T2A-GFP. Aus „pCDH Cloning and Expression Lentivectors – User Manual.v5" (System Biosciences).

7.1.8 Verwendete Oligonukleotide, Sonden und siRNAs

Oligonukleotide und Sonden:

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) in HPLC-Reinheit bezogen. Die TaqMan-Assays für MNX1 (Hs00907365_m1) und ACTB (Hs99999903_m1) wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen.

Name	Sequenz	Verwendung
Humane Primer:		
hPTGER2_F	CATCACCTTCGCCGTCTGC	qRT-PCR PTGER2
hPTGER2_R	CTAAGGATGGCAAAGACCCAAG	
HPGD_F2	CCAGCAACAACTGAGAGACACT	qRT-PCR HPGD
HPGD_R2	CCGCCTTCACCTCCATTTTG	
Hs00907365_m1	MNX1 TaqMan Assay (Applied Biosystems)	qRT-PCR HB9
Hs99999903_m1	ACTB TaqMan Assay (Applied Biosystems)	qRT-PCR Aktin
Murine Primer:		
mm-hb9-RT-fwd	CATGATCCTGCCCAAGATG	qRT-PCR HB9
mm-hb9-RT-rev	GTAGCCACCTCAAAACGCTTG	
mActin_F3	TCTTTGCAGCTCCTTCGTTGC	qRT-PCR Aktin
mActin_R3	CACGATGGAGGGGAATACAG	
mActin_S1_HEX	HEX-CACCCGCCACCAGTTCGCCATGGATG-BHQ1	Sonde qRT-PCR Aktin
copGFP_276_F	CACCCGCATCGAGAAGTACG	qRT-PCR GFP
copGFP_370_R	CCACCTTGAAGTCGCCGATC	
copGFP_S1_FAM	FAM-CACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAG-BHQ1	Sonde qRT-PCR GFP
HB9ref_1095F	GGACCATTTCCCCTACAGCAA	PCR HB9-GFP
copGFP_53-34R	GTGATGCGGCACTCGATCTC	
EF1_2352-2372_F	TGGAGCCTACCTAGACTCAGC	PCR EF1-GFP
copGFP_53-34R	GTGATGCGGCACTCGATCTC	
copGFP_410F	GACAGCGTGATCTTCACCGA	PCR GFP
copGFP_671R	GTCTTGAAGGCGTGCTGGTA	

siRNA:

siRNA-Pools wurden von der Firma Dharmacon bezogen und sind nachfolgend aufgeführt:

p53 siRNA: ON-TARGETplus TP53 siRNA

nt siRNA: ON-TARGETplus Non-targeting siRNA

7.1.9 Enzyme und enzymatische Kits

Name	Firma
Taq Polymerase	Qiagen (Hilden)
Phusion GC Master Mix	NEB (Frankfurt a. M.)
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Power Sybr green PCR Master Mix	Invitrogen (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt a. M.)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Penzberg)
SuperScript II (RNAseq *Library* Herstellung)	Invitrogen (Darmstadt)

7.1.10 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper:

Target	Bezeichnung	Spezies	Firma
HB9	H-20	Ziege	Santa Cruz (Heidelberg)
HB9	#ABN174	Kaninchen	Merck (Darmstadt)
GFP	#AB513	Kaninchen	Evrogen (Moskau, Russland)
Aktin	AC-74	Maus	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
pp53(Ser15)	#9284	Kaninchen	Cell Signaling (Cambridge, UK)
p53	Ab6	Maus	Calbiochem (Darmstadt)
p21	12D1	Kaninchen	Cell Signaling (Cambridge, UK)
BCL-2	C-2	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
α-Maus IgG-HRP	#2005	Ziege	Santa Cruz (Heidelberg)
α-Ziege IgG-HRP	#2056	Esel	Santa Cruz (Heidelberg)
α-Kaninchen IgG-HRP	#2004	Ziege	Santa Cruz (Heidelberg)
α-Ziege AF594	#A27016	Kaninchen	Invitrogen (Darmstadt)

7.1.11 FACS-Antikörper und *Gating*

Gating:

Zelltyp	Gating
B-Zellen:	
B-Zellen gesamt	CD45.2+ B220+
B-Zell Vorläufer im Knochenmark:	
CD93+	CD45.2+ B220+ CD93+
CD93-	CD45.2+ B220+ CD93-
T-Zellen:	
CD8+ T-Zellen	CD45.2+ CD8+
CD4+ T-Zellen	CD45.2+ CD4+
T-Zellen gesamt	Summe CD45.2+ CD4+/CD8+
T-Zell Vorläufer im Thymus:	
DP	CD45.2+ CD4+ CD8+
CD4+	CD45.2+ CD4+ CD8-
CD8+	CD45.2+ CD4- CD8+
DN	CD45.2+ CD4- CD8-
Myeloide Zellen:	
Makrophagen	CD45.2+ CD11b+ Nk1.1- CD11c- Gr-1low/neg SSClow
Monozyten	CD45.2+ CD11b+ Nk1.1- CD11c- Gr-1+ SSClow
Eosinophile Granulozyten	CD45.2+ CD11b+ Nk1.1- CD11c- Gr-1low/neg SSChigh
Neutrophile Granulozyten	CD45.2+ CD11b+ Nk1.1- CD11c- Gr-1+ SSChigh
Stamm-/Progenitorzellen:	
LSK-Zellen	Lin- Sca-1+ c-Kit+
LT-HSZ	Lin- Sca-1+ c-Kit+ CD34- Flk-2-
ST-HSZ	Lin- Sca-1+ c-Kit+ CD34+ Flk-2-
MPP	Lin- Sca-1+ c-Kit+ CD34+ Flk-2+
Lymphoide Progenitoren	Lin- IL7Rα+
Myeloide Progenitoren	Lin- IL7Rα-
CMP	Lin- IL7Rα- c-Kit+ Sca-1- FcγRlow CD34+
GMP	Lin- IL7Rα- c-Kit+ Sca-1- FcγRhigh CD34+
MEP	Lin- IL7Rα- c-Kit+ Sca-1- FcγRlow CD34-

FACS-Antikörper:

FACSCalibur:

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	BD (Heidelberg)
CD3e	PE	145-2C11	BD (Heidelberg)
CD3e	APC	145-2C11	BD (Heidelberg)
CD4	APC	RM4-5	BD (Heidelberg)
CD8b.2	PE	53-5.8	BD (Heidelberg)
TCRβ	PE	H57-597	BD (Heidelberg)
CD19	PE	1D3	BD (Heidelberg)
IgM	APC	II/41	BD (Heidelberg)
IgD	APC	11-26c.2a	BD (Heidelberg)
Gr-1	APC	RB6-8C5	BD (Heidelberg)
Nk-1.1	PE	PK136	BD (Heidelberg)
CD45.1	PE	A20	BD (Heidelberg)
CD11b	PE	M1/70	BD (Heidelberg)

CyAn:

Stamm-/Progenitorzellen:

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma
Sca-1 (Ly-6A/E)	PE	D7	BD (Heidelberg)
CD135 (Flk-2)	PE-CF594	A2F10.1	BD (Heidelberg)
Lin-	Biotin	#130-092-613	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD45.1	Biotin	A20	BD (Heidelberg)
Biotin	PerCP-Cy5.5	#551419	BD (Heidelberg)
CD127 (IL7Rα)	PE-Cy7	SB/199	BD (Heidelberg)
CD34	Alexa Fluor 647	RAM-34	BD (Heidelberg)
CD16/CD32 (FcγR)	eFluor 450	93	eBioscience (Frankfurt a. M.)
CD117 (c-Kit)	APC-H7	2B8	BD (Heidelberg)

B-Zellen:

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma
CD43	PE	S7	BD (Heidelberg)
Early B lineage (CD93)	PE-CF594	AA4.1	BD (Heidelberg)
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	BD (Heidelberg)
IgM	PE-Cy7	R6-60.2	BD (Heidelberg)
IgD	APC	11-26c.2a	BD (Heidelberg)
CD45R/B220	eFluor 450	RA3-6B2	eBioscience (Frankfurt a. M.)
CD19	APC-H7	1D3	BD (Heidelberg)

T-Zellen:

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma
CD8	PE	53-5.8	BD (Heidelberg)
CD4	PE-CF594	RM4-5	BD (Heidelberg)
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	BD (Heidelberg)
Ter119	PE-Cy7	TER-119	BD (Heidelberg)
CD3e	APC	145-2C11	BD (Heidelberg)
TCRβ	eFluor 450	H57-597	eBioscience (Frankfurt a. M.)

Myeloide Zellen:

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma
F4/80 Like Receptor	PE	6F12	BD (Heidelberg)
CD11b	PE-CF594	M1/70	BD (Heidelberg)
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	BD (Heidelberg)
Nk-1.1	PE-Cy7	PK136	BD (Heidelberg)
Gr-1	APC	RB6-8C5	BD (Heidelberg)
CD11c	APC-Cy7	HL3	BD (Heidelberg)

7.1.12 Zellbiologische Kits

Name	Firma
Lineage Cell Depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
LD-Columns	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
CD34 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
LS-Columns	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Caspase Glo 3/7 Assay	Promega (Mannheim)
Cell Titer Glo	Promega (Mannheim)
Senescence Cells Histochemical Staining Kit	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD (Heidelberg)
ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI	Invitrogen (Darmstadt)
Phalloidin AF660	Invitrogen (Darmstadt)

7.1.13 Molekularbiologische Kits

Name	Verwendung	Firma
RNeasy Protect Animal Blood Kit	RNA-Isolation Mausblut	QIAGEN (Hilden)
RNA Protect Animal Blood Tubes	RNA-Isolation Mausblut	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolation	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Micro Kit	RNA-Isolation	QIAGEN (Hilden)
QIAamp DNA Micro Kit	DNA-Isolation	QIAGEN (Hilden)
AllPrep DNA/RNA Micro Kit	DNA/RNA-Isolation	QIAGEN (Hilden)
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	DNA/RNA-Isolation	QIAGEN (Hilden)
Fast Plasmid Mini Kit	Isolation von Plasmid DNA	5´Prime (Hilden)
Nucleobond Xtra Maxi Kit	Isolation von Plasmid DNA	Macherey-Nagel (Düren)
Endotoxin Free Plasmid Maxi Kit	Isolation von Plasmid DNA	QIAGEN (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCRs	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	QIAGEN (Hilden)
DyeEx2.0 Spin Kit	Aufreinigung von Sequenzierreaktionen	QIAGEN (Hilden)
ECL Westernblot Detection Reagent	*Westernblot* Detektionsreagenz	GE-Healthcare (Frankfurt a.M.)
Bradford Protein Assay	Bestimmung der Proteinkonzentration	BioRad (München)
TruSeq RNA Sample Prep Kit v2	RNAseq Library Herstellung	Illumina (San Diego, USA)
Agencourt AMPure XP	RNAseq Library Herstellung	Beckman Coulter (Krefeld)
TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS	RNAseq Library Herstellung	Illumina (San Diego, USA)
TruSeq SBS Kit v3-HS	RNAseq Library Herstellung	Illumina (San Diego, USA)

7.1.14 Verwendete Programme und Datenbanken

Programm	Funktion	Bezugsquelle
Primer3	Primerdesign	www.bioinfo.ut.ee/primer3/
Primer-BLAST	Primerdesign	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
ApE-A Plasmid Editor	in silico DNA-Manipulation	M. Wayne Davis
BioGPS	Genexpressions-Datenbank	www.BioGPS.org
FlowJo	FACS-Auswertung	FlowJo LLC
MultiGauge	Densitometrie	GE Healthcare
GraphPad Prism	Daten-Auswertung	GraphPad Software, Inc.

7.1.15 Puffer

Name	Zusammensetzung
6x DNA Ladepuffer	60 % Glyzerin; 60 mM Tris-HCL pH 8,0; 6 mM EDTA; pH 8,0; 0,05 % Bromphenolblau
50x TAE Puffer	BioRad
SDS-Acrylamid-Trenngel (10 %)	10 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 375 mM Tris pH 8,8; 1 % SDS; 1 % APS; 0,05 % Temed
SDS Sammelgel (4 %)	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 125 mM Tris pH 6,8; 1 % SDS; 1 % APS; 0,1 % Temed
Lämmli Laufpuffer	25 mM Tris; 191 mM Glycin; 1 % SDS
Lämmli Blotpuffer	25 mM Tris; 191 mM Glycin
5x Lämmli DTT Ladepuffer	250 mM Tris pH 6,8; 10 % SDS; 500 mM DTT; 50 % Glyzerin; 0,5 % Bromphenolblau
TBS-T	137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCL pH 6,8; 0,05 % Tween-20
RIPA-Puffer	150 mM Natriumchlorid; 1,0 % Igepal; 0,5 % Natriumdeoxycholate; 0,1 % SDS; 50 mM Tris, pH 8,0
RF1 Puffer	100 mM RbCl2; 50 mM MnCl2; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl2; 15 % Glyzerin; pH 5,8
RF2 Puffer	10 mM MOPS; 10 mM RbCl2; 75 mM CaCl2; 15 % Glyzerin; pH 6,8
Nicoletti-Puffer	0,1 % Natriumcitrat; 50 µg/ml Propidiumiodid; 0,1 % Triton X-100
MACS-Puffer	Miltenyi Biotech

7.1.16 Geräte

Bezeichnung	Funktion	Firma
CFX96 Connect	Real Time PCR Gerät	BioRad (München)
Mastercycler gradient	PCR Gerät mit Gradient	Eppendorf (Hamburg)
GeneAmp PCR System 2700	PCR Gerät	Applied Biosystems (Darmstadt)
Eppendorf BioPhotometer	Photometer	Eppendorf (Hamburg)
NanoDrop ND-1000	Messung von Nukleinsäuren	Thermo Scientific (Darmstadt)
pH Meter	pH-Meter	WTW (Weilheim)
HERAEUS Fresco 21	Tischzentrifuge	Thermo Scientific (Darmstadt)
Multifuge 4KR	Standzentrifuge	Thermo Scientific (Darmstadt)
J2-21	Großzentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Axiovert 200	Inverses Zellkultur Mikroskop	Zeiss (Jena)
AxioObserver Z1	Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss (Jena)
Mini Protean Tetra Cell	Protein Elektrophorese Laufmodul	BioRad (München)
Mini Trans Blot Cell	Protein Elektrophorese Blotmodul	BiorRad (München)
DynaMag™-96 Side Magnet	Magnet	Thermo Scientific (Darmstadt)
Wide Mini Sub Cell GT	DNA Elektrophoresekammer	BioRad (München)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Kapillargelelektrophorese	Agilent Technologies (Böblingen)
Certomat	Bakterienschüttler	B.Braun (Melsungen)
Thermomixer comfort	temperierte Inkubation unter schütteln	Eppendorf (Hamburg)
Luminoscan Ascent	Luminometer	Thermo Scientific (Darmstadt)
Transilluminator Las- 3000	Chemiluminescent Dokumentation	GE-Healthcare (Frankfurt a.M.)
PowerPac 30	Power Supply	BioRad (München)
Intas UV Gel Dok Mini	Agarosegel-Dokumentation	Intas (Göttingen)
HiSeq 2500	Hochdurchsatzsequenzierung	Illumina (San Diego, CA,USA)
cBot System	Hochdurchsatzsequenzierung	Illumina (San Diego, CA,USA)
Biobeam GM 2000	Myeloablative Bestrahlung der Mäuse	Gamma-Service Medical (Leipzig)
CyAN	Durchflusszytometer	Beckman Coulter (Krefeld)
FACS Calibur	Durchflusszytometer	BD (Heidelberg)
3130 Genetic Analyzer	Sequenzierung	Applied Biosystems (Darmstadt)
ViCell XR	Cellcounter	Beckman Coulter (Krefeld)
Microplate Reader Spark 10M	Luminometer	Tecan (Crailsheim)
Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser	Reagenzien-Dispenser	Thermo Scientific (Darmstadt)
Digital Dispenser D300e	Dispenser	Tecan (Crailsheim)
QuadroMACS Separator	Magnet	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

7.1.17 Sequenz HB9-T2A-GFP

Dargestellt ist die HB9 (gelb)-T2A (rot)-GFP (grün)-Sequenz.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1171 CCCCCGCGGCCCAGCCACCAGCCCGCGCCCCAGGAATTCGAAGGATCCGCGGCCGCTgagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgac
 391  P  P  R  P  S  H  Q  P  A  P  Q  E  F  E  G  S  A  A  A  E  G  R  G  S  L  L  T  C  G  D

1261 gtggaggagaatcccggcccttccggaatggagagcgacgagagcggcctgcccgccatggagatcgagtgccgcatcaccggcaccctg
 421  V  E  E  N  P  G  P  S  G  M  E  S  D  E  S  G  L  P  A  M  E  I  E  C  R  I  T  G  T  L

1351 aacggcgtggagttcgagctggtgggcggcggagagggcacccccaagcagggccgcatgaccaacaagatgaagagcaccaaaggcgcc
 451  N  G  V  E  F  E  L  V  G  G  G  E  G  T  P  K  Q  G  R  M  T  N  K  M  K  S  T  K  G  A

1441 ctgaccttcagcccctacctgctgagccacgtgatgggctacggcttctaccacttcggcacctaccccagcggctacgagaaccccttc
 481  L  T  F  S  P  Y  L  L  S  H  V  M  G  Y  G  F  Y  H  F  G  T  Y  P  S  G  Y  E  N  P  F

1531 ctgcacgccatcaacaacggcggctacaccaacacccgcatcgagaagtacgaggacggcggcgtgctgcacgtgagcttcagctaccgc
 511  L  H  A  I  N  N  G  G  Y  T  N  T  R  I  E  K  Y  E  D  G  G  V  L  H  V  S  F  S  Y  R

1621 tacgaggccggccgcgtgatcggcgacttcaaggtggtgggcaccggcttccccgaggacagcgtgatcttcaccgacaagatcatccgc
 541  Y  E  A  G  R  V  I  G  D  F  K  V  V  G  T  G  F  P  E  D  S  V  I  F  T  D  K  I  I  R

1711 agcaacgccaccgtggagcacctgcaccccatgggcgataacgtgctggtgggcagcttcgcccgcaccttcagcctgcgcgacggcggc
 571  S  N  A  T  V  E  H  L  H  P  M  G  D  N  V  L  V  G  S  F  A  R  T  F  S  L  R  D  G  G

1801 tactacagcttcgtggtggacagccacatgcacttcaagagcgccatccaccccagcatcctgcagaacgggggccccatgttcgccttc
 601  Y  Y  S  F  V  V  D  S  H  M  H  F  K  S  A  I  H  P  S  I  L  Q  N  G  G  P  M  F  A  F

1891 cgccgcgtggaggagctgcacagcaacaccgagctgggcatcgtggagtaccagcacgccttcaagaccccatcgccttcgccagatcc
 631  R  R  V  E  E  L  H  S  N  T  E  L  G  I  V  E  Y  Q  H  A  F  K  T  P  I  A  F  A  R  S

1981 cgcgctcagtcgtccaatttctgccgtggacggcaccgccggacccggctccaccggatctcggctag
 661  R  A  Q  S  S  N  S  A  V  D  G  T  A  G  P  G  S  T  G  S  R  *
```

Eigene Veröffentlichungen

In Präparation:

- **Ingenhag** *et al.*
  „HB9 induces senescence and blocks differentiation in hematopoietic stem and progenitor cells“

Publiziert:

- Auer F, **Ingenhag D**, Bhatia S, Enczmann J, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I, Borkhardt A, Hauer J.
  “GEMMs addressing Pax5 loss-of-function in childhood pB-ALL”, Eur J Med Genet. 2015 Nov 26 (15)

- Vicente-Dueñas C, Hauer J, Ruiz-Roca L, **Ingenhag D**, Rodríguez-Meira A, Auer F, Borkhardt A, Sánchez-García I.
  “Tumoral stem cell reprogramming as a driver of cancer: Theory, biological models, implications in cancer therapy” Semin Cancer Biol. 2015 Jun;32

- Wildenhain S und **Ingenhag D**, Ruckert C, Degistirici Ö, Dugas M, Meisel R, Hauer J, Borkhardt A.
  “Homeobox protein HB9 binds to the prostaglandin E receptor 2 promoter and inhibits intracellular cAMP mobilization in leukemic cells.” J Biol Chem. 2012 Nov 23;287(48)

- Thiel A, Beier M, **Ingenhag D**, Servan K, Hein M, Moeller V, Betz B, Hildebrandt B, Evers C, Germing U, Royer-Pokora B.
  “Comprehensive array CGH of normal karyotype myelodysplastic syndromes reveals hidden recurrent and individual genomic copy number alterations with prognostic relevance.” Leukemia. 2011 Mar;25(3)

Kongressbeiträge

- **Deborah Ingenhag**, Franziska Auer, Arndt Borkhardt, Julia Hauer
  „HB9 represses hematopoietic stem cell proliferation and induces senescence“
  58th American Society of Hematology Annual Meeting (ASH), 2016, San Diego

- **Deborah Ingenhag**, Franziska Auer, Daniel Picard, Andreas Kloetgen, Jessica Höll, Marc Remke, Gesine Kögler, Arndt Borkhardt, Julia Hauer
  „Induction of senescence is the first evidence for an oncogenic potential of HB9“
  IBFM 2016, 10th Biennial Childhood Leukemia Symposium, 2016, Athen

- **Deborah Ingenhag**, Sarah Wildenhain, Christian Ruckert, Özer Degistirici, Martin Dugas, Roland Meisel, Arndt Borkhardt, Julia Hauer
  „Identification of target genes of the transcription factor HB9 in hematopoietic cells and its role in hematopoiesis”
  17th congress of the European Hematology Association (EHA), 2012, Amsterdam

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vorname:	Deborah
Name:	Ingenhag
Geburtsdatum:	4.6.1985
Geburtsort:	Köln
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Hochschulstudium:

Okt. 2010 – Jan. 2017	Promotionsstudium in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Prof. Dr. A. Borkhardt
März 2009 – Mai 2010	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Prof. Dr. B. Royer-Pokora Thema: „Molekulargenetische Analyse von 5q Deletionen und Charakterisierung der Bruchpunkte/Gene“
Okt. 2004 – Mai 2010	Diplomstudium der Biologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Note 1,18)

Schulausbildung:

Juni 2004	Abitur an dem Gymnasium Marienschule Krefeld

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den

Deborah Ingenhag

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Borkhardt für die Möglichkeit diese Arbeit im KMT-Labor der Kinderklinik anfertigen zu können und für seine fachliche Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken.
Herrn Prof. Beye danke ich herzlichst für die Übernahme des Ko-Referats.
Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau PD Dr. Julia Hauer für die kontinuierliche und sorgfältige Betreuung dieser Arbeit, in Form von fachlicher Diskussion und stetiger Motivation. Ganz besonders möchte ich mich bei Ihr zudem für das Eröffnen neuer Blickwinkel und für ihre Unterstützung bedanken, nicht zuletzt bei der Endkorrektur dieser Arbeit.
Weiterhin möchte ich mich bei meiner ehemaligen Kollegin Sarah Wildenhain bedanken, die Ihre Begeisterung für dieses Projekt vollends auf mich übertragen und mir den Einstieg leicht gemacht hat.
Für die Unterstützung bei den Transplantationsexperimenten, sowie im Laboralltag möchte ich mich bei meiner Kollegin Franziska Auer ganz herzlich bedanken.
Bei Silke Furlan bedanke ich mich für die exzellente technische Unterstützung und den unermüdlichen Einsatz für unsere Arbeitsgruppe, ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre.
Bei der AG Höll bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Hochdurchsatzsequenzierung. In diesem Rahmen möchte ich mich zudem ganz herzlich bei Daniel Picard, für die bioinformatische Auswertung der RNAseq, sowie für die unermüdliche Diskussions-Bereitschaft, bedanken.
Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mark Remke für die Bereitstellung der Wirkstofflibraries und Herrn David Pauck für die Durchführung des *Screenings*.
Bei Frau Prof. Dr. Kögler bedanke ich mich für die Bereitstellung des Nabelschnurblutes.
Ein lieber Dank geht an Frau Katharina Raba für das FACS-Sorting, sowie die Unterstützung bei den FACS-Einstellungen.

Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich an alle meine Laborkollegen für die herzliche und familiäre Stimmung im Labor, sowie schöne Abende abseits des Laboralltags.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Sven für die unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, sowie stetige Motivation. Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Familie, die mich in jeder Hinsicht voll und ganz unterstützt hat.