

Untersuchung der molekularbiologischen Relevanz des Transkriptionsfaktors IRX1 im Kontext einer MLL-AF4-assoziierten Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von

Alessa Carina Kühn

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2017

(D30)

vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek, Institut für Pharmazeutische Biologie
Fachbereich 14

2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie
Fachbereich 14

Datum der Disputation:

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Das hämatopoietische System und seine Aufgaben	3
1.2 Leukämie im Allgemeinen.....	5
1.3 Genetische Aberrationen und ihre Relevanz bei der Entstehung von Leukämien	9
1.4 Das MLL (mixed-lineage-leukemia)-Protein und seine Funktionen	11
1.4.1 MLL-Translokationen im Kontext einer Leukämie und die Rolle assoziierender Komplexe des chimären MLL-Proteins	17
1.5 Die HOX-Gene und ihre funktionellen und regulatorischen Aufgaben.....	23
1.5.1 Assoziation der HOX-Genexpression mit der Entstehung verschiedener Leukämien.....	25
1.6 Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren des IRX-Clusters	29
1.6.1 Krebserkrankungen im Kontext einer IRX-Deregulierung	30
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	33
2 ERGEBNISSE	35
2.1 Vorarbeiten zu diesem Thema.....	35
2.2 Reprimierung der HOXA-Gene durch die IRX-Transkriptionsfaktoren	36
2.3 Beeinflussung der MLL-AF4-Komplexbildung durch IRX1.....	40
2.4 Chromatin-Immunpräzipitationsanalyse zur Klärung der funktionellen Interaktion der IRX1/MLL-AF4-Verbindung.....	43
2.5 Investigation des Effekts des pan-HDAC-Inhibitors Trichostatin A auf die funktionellen und die komplex-bildenden Eigenschaften des IRX1/MLL-AF4- Komplexes	47
2.6 Etablierung der nicht-viralen, stabilen Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation	51
2.7 Verstärkung des reprimierenden Effekts des IRX1 durch simultane EGR- Expression.....	53
2.8 Direkte Aktivierung des HOXB4 durch IRX1 und Induktion des HOXB4- spezifischen Expressionsprogramms	56
2.9 Negativergebnisse	60
2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufklärung der regulatorischen und proteinbiochemischen Interaktionen des IRX1 im Kontext einer t(4;11)- Leukämie.....	62
3 DISKUSSION	63
3.1 Der Einfluss des Transkriptionsfaktors IRX1 auf die HOXA-Genexpression in t(4;11)-basierten Leukämien.....	63

3.2	Der MLL-AF4-Multiproteinkomplex wird durch IRX1 erweitert: Die Folgen einer Inkorporation auf molekularbiologischer Ebene	66
3.3	Einblicke in den Fortschritt der pharmakologischen Inhibierung MLL-r-assoziiierter Faktoren	68
3.3.1	HDAC-Inhibitoren	68
3.3.2	MENIN1-Inhibitoren	71
3.3.3	DOT1L-Inhibitoren	72
3.3.4	BET-Inhibitoren	73
3.3.4.1	Fazit	74
3.4	IRX1 induziert direkt und indirekt die Expression der für das hämatopoietische System wichtigen Gene	76
4	MATERIAL UND METHODEN	82
4.1	Material.....	82
4.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	82
4.1.2	Chemikalien.....	83
4.1.3	Sonstige Materialien	84
4.1.4	Medien, Zusätze und Reagenzien	85
4.1.4.1	Medien und Zusätze für die Zellkultur	85
4.1.4.2	Nährmedien für E. coli	86
4.1.5	Puffer und Lösungen	86
4.1.6	Oligonukleotide.....	89
4.1.7	Enzyme	92
4.1.8	Antikörper.....	92
4.1.8.1	Primäre Antikörper.....	92
4.1.8.2	Sekundäre Antikörper	93
4.1.9	Organismen.....	94
4.1.9.1	Zelllinien	94
4.1.9.2	Bakterienstämme.....	94
4.1.10	Vektoren und Plasmide	95
4.2	Molekularbiologische Methoden	96
4.2.1	Standardmethoden.....	96
4.2.2	RT-PCR (Real Time-PCR).....	97
4.2.3	Sequenzierung	98
4.2.4	Proteinextraktion	98
4.2.5	Western Blot und Membran-Stripping	98
4.2.6	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	99
4.2.7	Co-Immunpräzipitation (CoIP)	102
4.3	Zellbiologische Methoden.....	102
4.3.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen	102
4.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen	103
4.3.3	Bestimmung der Zellzahl	103
4.3.4	Transfektionen.....	103
4.3.4.1	Stabile und transiente Transfektionen von HEK293T-Zellen mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI)	103
4.3.4.2	Transfektion der Suspensionszelllinie SEM/Nukleofektion.....	104

4.3.5	Anregung der verschiedenen Fluoreszenzmarker	104
4.3.6	Herstellung von Dauerkulturen	105
4.3.7	Viabilitätsmessung/Zytotoxizitätsmessung mittels CCK-8	105
4.3.8	Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung (PI)	105
4.4	Datenverarbeitung.....	106
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	109
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	127
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	128
9	DANKSAGUNG	129
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	130
11	PERSÖNLICHE DATEN	131
11.1	Lebenslauf	131
11.2	Publikationen, Poster, Vorträge	132

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung von Leukämien steht meist im Zusammenhang mit chromosomalen Translokationsereignissen, bei denen vor allem das *MLL (Mixed Lineage Leukemia)*-Gen auf Chromosom 11q23 involviert ist. Die häufigste Translokation, die eine Akute Lymphatische Leukämie (ALL) bei Kleinkindern auslöst, stellt die t(4;11)-Translokation dar. Die Rekombination der Chromosomen 11 und 4 führt hierbei zur Entstehung der beiden Fusionsproteine MLL-AF4 und AF4-MLL. Bisherige Studien, die den Krankheitsmechanismus hinter dieser ALL-Form untersuchten, identifizierten eine charakteristische Überexpression der *HOXA*-Gene als einen besonderen Treiber dieser Krankheitsentstehung. Durch die Deregulierung des *HOX*-Clusters durch das chimäre MLL-AF4-Protein wird ein Differenzierungs- und Apoptoseblock induziert und eine stetige Proliferation der Zellen gefördert.

Arbeiten von Trentin *et al.* (2009) klassifizierten eine Subgruppe von t(4;11)-Patienten, die, im Gegensatz zu den bisher charakterisierten ALL-Leukämien, eine Reprimierung ihrer *HOXA*-Cluster aufwiesen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren. Das Genexpressionsprofil dieser *HOXA*^{low}-Patienten sprach für einen neuen Krankheitsmechanismus. Allen *HOXA*^{low}-Patienten war zudem gemein, dass sie eine Überexpression des Transkriptionsfaktors IRX1 aufwiesen.

Die Relevanz dieses Transkriptionsfaktors im Kontext einer t(4;11)-Leukämie wurde durch diese Doktorarbeit genauer untersucht. Durch Vorarbeiten mit transient exprimiertem *IRX1* in HEK293T-Zellen wurde eine DNA-Microarray-Analyse durchgeführt, durch die ein Genexpressionsprofil (GEP) dieser Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (mit dem Leervektor transfiziert) erstellt wurde. Dies schuf die Grundlage für die Durchführung weiterer Experimente, die mit Hilfe von RT-PCR-, Chromatin-Immunpräzipitations-, Co-Immunpräzipitations- und Western Blot-Versuchen den Effekt und das Verhalten des IRX1-Proteins im Zusammenhang mit MLL-AF4, bzw. die Funktion von IRX1 alleine, charakterisieren sollten.

Es zeigte sich, dass IRX1 eine Reprimierung der *HOXA*-Gene induziert und dieser Effekt über den aktivierenden Effekt des chimären MLL-AF4-Proteins dominiert. Dies geschah jedoch auf zwei unterschiedliche Wege, da zum einen das IRX1 in der Abwesenheit von MLL-AF4 nicht direkt an die *HOXA*-Gene binden kann und zum anderen durch MLL-AF4 eine Inkorporation des IRX1 in den Multiproteinkomplex des chimären Onkoproteins stattfindet und IRX1 dadurch direkt an die *HOXA*-Promotoren gelangt. Zudem wurden

weitere direkte und indirekte Zielgene des IRX1 identifiziert. Zu ihnen zählen *MEIS1*, *HOXB4* und *EGR1-3*.

Durch die Erweiterung der Versuche durch Behandlungen mit dem pan-HDAC-Inhibitor Trichostatin A konnte belegt werden, dass MLL-AF4 vom Promotor seiner Zielgene dissoziiert und durch das endogene wt-MLL ersetzt werden kann. Trotz der inhibitorischen Wirkung des IRX1 auf das MLL-AF4 verursacht es eine Stabilisierung des MLL-AF4 an den Promotoren seiner Zielgene, was eine Dissoziation des Komplexes durch TSA verhindert. Die Applikation von TSA führt unabhängig von der vorherigen Konstitution (\pm IRX1) aber auch zu einer Normalisierung der *HOXA*-Expression.

Die vorgelegten Daten verdeutlichen, dass IRX1 kausal für das GEP der *HOXA*^{low}-Patienten verantwortlich ist und durch seine Anwesenheit wichtige Regulatoren der Differenzierung und der Zellzyklusregulierung gestört werden. Zudem wurde der Benefit einer Histondeacetylaseinhibitor (HDACi)-Behandlung bei dieser Patientenkohorte hervorgehoben, da der inhibierende Effekt des IRX1 auf die *HOXA*-Gene aufgehoben und das wt-MLL in seiner Funktionsfähigkeit nicht beeinträchtigt wurde. Die Relevanz des IRX1 im Kontext einer t(4;11)-Leukämie wurde somit aufgeklärt und ein neuer Krankheitsmechanismus der *HOXA*^{low}-Patientenkohorte definiert.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Etablierung eines Transfektionsprotokolls, um eine stabile Integrationen der *Sleeping Beauty*-Konstrukte in t(4;11)-Suspensionszellen zu ermöglichen. Bisher war es nur über lentivirale Methoden möglich, diese Zellen genetisch zu manipulieren. Durch die hier vorgestellte Methode können nun SEM-Zellen (B-Zell-Vorläuferzellen einer ALL mit t(4;11)) über Elektroporation stabil transfiziert und anschließend über Selektion zu einer homogenen Zellpopulation positiv transfizierter Zellen herangezogen werden. Hierdurch wird eine Übertragung bisheriger Methoden in ein leukämisches Zellsystem möglich, wodurch genetische Manipulationen in einer physiologischen Umgebung getestet werden können, ohne in S2-Laboratorien arbeiten zu müssen.

1 EINLEITUNG

1.1 Das hämatopoietische System und seine Aufgaben

Der Prozess der Hämatopoese beschreibt die Produktion der festen Bestandteile des menschlichen Blutes und findet im roten Knochenmark statt. Dieses befindet sich in den *Trabeculae* des Knochengewebes des axialen Skeletts (Brust-/Hüftknochen) sowie in den Epiphysen der Oberarm- und Oberschenkelknochen. Es besteht aus pluripotenten Stammzellen (HSC: *hematopoietic stem cell*), die sich in myeloische und lymphatische Stamm- bzw. Vorläuferzellen differenzieren. Diese wiederum generieren teilweise CFUs (*colony-forming units*): CFU-E (Erythrozyten), CFU-Meg (Megakaryozyten) und CFU-GM (Makrophagen und Granulozyten) und weitergehend Blasten (Vorläuferzellen), die sich dann in die jeweiligen festen Bestandteile des Blutes differenzieren (siehe Abbildung 1; Eaves, 2015; Tortora und Derrickson, 2008). Mit zunehmendem Alter und zunehmendem Wachstum lagern sich in einem Großteil des roten Knochenmarks der Markhöhlen Fettzellen ein, woraufhin das gelbe Knochenmark nicht mehr zur Blutzellproduktion fähig ist.

Das menschliche Blut ist das regenerativste Gewebe des Körpers und versorgt diesen nicht nur mit Sauerstoff aus der Lunge, sondern gilt auch als Schnittstelle zwischen Körper und Organen. Es werden Nährstoffe aus dem Verdauungstrakt sowie Metabolite, Hormone, Enzyme und Vitamine über das Blutsystem transportiert und zu ihrem Bestimmungsort befördert. Zudem werden auch die Körpertemperatur und der pH-Wert über das Blut reguliert sowie Schutz vor Krankheitserregern durch die Produktion von Antikörpern oder Phagozytose vermittelt. Das Blut transportiert Abbauprodukte (z.B. Harnstoff, Harnsäure, Kreatin, Ammoniak, Bilirubin) und Kohlenstoffdioxid zur Lunge, Leber, Haut oder Niere, wo diese vom Körper eliminiert werden. Somit lassen sich drei Hauptaufgaben des Blutes formulieren: Transport – Regulierung – Schutz.

Die hauptsächlichen Blutkomponenten eines gesunden, erwachsenen Menschen umfassen in etwa 55 % Plasma und 45 % zelluläre Bestandteile. Das Blutplasma enthält neben Wasser auch einige Proteine, wie Albumine, Globuline und Fibrinogen, sowie gelöste Stoffe, wie Elektrolyte, Gase, Hormone und Nährstoffe. Neben den Erythrozyten umfassen die festen Bestandteile des Blutes auch Thrombozyten und Leukozyten. Letztere untergliedern sich aufgrund ihres Erscheinungsbildes und ihrer Aufgaben in Lympho-, Mono- und Granulozyten.

Erythrozyten machen den Hauptteil der festen Blutbestandteile aus. Das Verhältnis zwischen Erythrozyten und Leukozyten beträgt im Normalzustand etwa 700:1. Erythrozyten besitzen das sauerstoffbindende Protein Hämoglobin und differenzieren sich

aus myeloischen Stammzellen. Thrombozyten differenzieren sich ebenfalls aus diesen Stammzellen und steuern die Blutgerinnung.

Leukozyten enthalten im Gegensatz zu Erythrozyten kein Hämoglobin. Die einzelnen Bestandteile der weißen Blutkörperchen dienen der Einleitung und der Ausführung einer Immunantwort auf Pathogene oder fremde Substanzen. Dies geschieht entweder durch die Freisetzung von Substanzen wie Heparin oder Histamin, um eine Entzündungsantwort zu verstärken, der Produktion von Lysozym oder Oxidantien zur Vernichtung von Bakterien oder durch die Einleitung und die Ausführung einer Antigen-Antikörper-vermittelten Immunantwort. Die weißen Blutzellen stellen eine wichtige Instanz des adaptiven Immunsystems dar. Wird eine Immunreaktion oder eine Phagozytose durch ein Pathogen ausgelöst, verlassen sie über Diapedese den Blutkreislauf und versammeln sich am Invasionsherd. Die drei Hauptkomponenten hierbei sind die B- und T-Lymphozyten (B- und T- Zellen) sowie natürliche Killerzellen. Die B-Zellen stellen Immunglobulin her und koordinieren mit T-Zellen eine Immunantwort, um Infektionen oder Krebszellen zu bekämpfen. Die natürlichen Killerzellen gehören zum angeboren Immunsystem und erkennen und bekämpfen Mikroorganismen und spontan auftretende Tumorzellen. Ihre Zellerkennung ist weder antikörperbasiert noch T-Zellrezeptor-abhängig, sondern erfolgt über die Erkennung ungewöhnlicher Membranproteine, gefolgt von einer Eliminierung der Zellen durch Zytolyse oder Apoptose.

Die Granulozyten werden aufgrund der Anfärbarkeit ihrer Granula mit sauren oder basischen Farbstoffen klassifiziert und entwickeln sich aus myeloischen Stammzellen. Zu ihnen zählen basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten. Sie sind unter anderem an allergischen Reaktionen, Phagozytose und der Vernichtung von Parasiten und Bakterien beteiligt.

Die agranulären Leukozyten umfassen Lymphozyten und Monozyten. Monozyten können in Geweben je nach Bedarf zu Makrophagen differenzieren und Phagozytose vermitteln. Sie differenzieren ebenfalls aus myeloischen Stammzellen. Lymphozyten entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen und besitzen, wie alle anderen kernhaltigen Zellen des Körpers, MHC-Antigene. Sie untergliedern sich in T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen. Ihre Reifung findet in verschiedenen Organen, wie den Lymphknoten, der Leber oder der Milz statt.

Zwar ist ein Anstieg weißer Blutkörperchen im Blutkreislauf meist eine normale Reaktion auf Allergene oder Pathogene, jedoch kann eine Missverteilung der einzelnen Blutkomponenten auch auf schwerwiegende Erkrankungen, wie zum Beispiel Schilddrüsenunterfunktion, Tuberkulose oder Leukämie, hinweisen (Tortora und Derrickson, 2008).

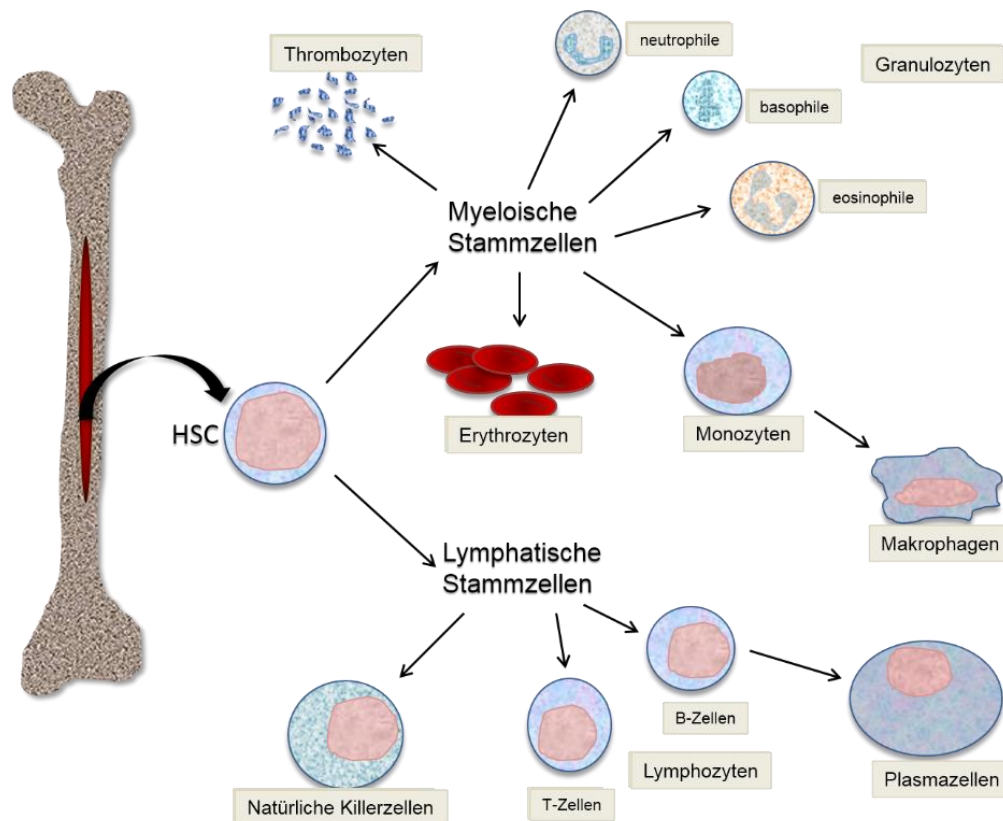


Abbildung 1: Hämatopoese. Ausgehend von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle, (HSC) bilden sich im roten Knochenmark myeloische und lymphatische Stammzellen, die sich in weitere feste Blutbestandteile differenzieren. Myeloische Stammzellen entwickeln sich zu Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil, basophil, eosinophil), Erythrozyten und Monozyten. Diese wiederum differenzieren sich zu Makrophagen. Lymphatische Stammzellen generieren natürliche Killerzellen sowie T- und B-Zellen, wobei sich letztere zu Plasmazellen differenzieren und für die Produktion von Antikörpern zuständig sind.

1.2 Leukämie im Allgemeinen

Der Begriff Leukämie (griechisch: leukós „weiß“ und haima „das Blut“) beschreibt eine Reihe neoplastischer Erkrankungen, die mit einer unkontrollierten Veränderung des roten Knochenmarks einhergehen. Hier proliferieren meist pluripotente Stammzellen durch einen durch genetische Aberrationen ausgelösten Apoptose- bzw. Differenzierungsblock autonom, sodass die Lymphozytopoese oder die Myelopoese gestört wird und in einer anämieartigen Symptomatik resultiert. Zu ihr gehören Blässe, Müdigkeit, Kurzatmigkeit sowie Kälteintoleranz, aber auch eine allgemeine Immunschwäche. Bei einem akuten Zustand kann durch die Anreicherung der Leukozyten in den Lymphknoten, der Leber oder der Milz eine Lymphadeno-, eine Hepato- oder eine Splenomegalie diagnostiziert werden. Zudem weisen Patienten häufig eine vermehrte Hämatom- und Petechienbildung

sowie eine verzögerte Hämostase auf (Munk, 2010; Pschyrembel, 2007; Tortora und Derrickson, 2008).

Als Auslöser einer malignen Transformation pluripotenter Stammzellen gelten zum einen ionisierende Strahlungen, wie sie bei einer Radiotherapie angewendet werden, chemische Substanzen, wie zum Beispiel Benzole oder Chemotherapien anderer Krebsarten, oder krankheitsgeschichtliche Vorbelastung, z.B. durch eine Trisomie 21 (Down-Syndrom). Durch diese Risikofaktoren können genetische Aberrationen induziert werden, die dazu führen, dass hämatopoietische Progenitorzellen ungehemmt proliferieren und, z.B. im Fall einer Leukämie, gesunde Vorläuferzellen verdrängen und zu einer Akkumulation weißer Blutkörperchen führen. Da unbehandelt somit keine korrekte Hämatopoese mehr erfolgen kann, bedingt eine solche Dysregulation den Tod (Munk, 2010; Tortora und Derrickson, 2008). Viele der präleukämischen Zellen besitzen Stammzeleigenschaften, wie eine immense Proliferation mit wenig bis keiner Differenzierung. Zudem sind diese Zellen unabhängig oder sogar resistent gegen Apoptose (Szczepański *et al.*, 2010).

Es gibt verschiedene Arten von Leukämien. Bei einer akuten Form treten die genannten Symptome rasch auf und der Gesundheitszustand des betroffenen Patienten verschlechtert sich binnen weniger Tage drastisch. Der Krankheitsverlauf einer chronischen Leukämie zieht sich über mehrere Monate oder Jahre, sodass die Diagnose meist zufällig erfolgt. Aufgrund der langsamen Proliferation der entarteten Blutzellen zeigt sich eine typische Symptomatik erst bei fortschreitendem Krankheitsverlauf. Neben einer akuten oder einer chronischen Form lassen sich auch myeloische und lymphatische Leukämien unterscheiden. Als Klassifikationsmarker dienen hier die Vorläuferzellen der entarteten Blasten. Bei den Akuten Leukämien unterscheidet man zwischen Akuten Myeloischen Leukämien (AML) und Akuten Lymphatischen Leukämien (ALL). Ebenso unterteilt man chronische Leukämien in Chronisch Lymphatische Leukämien (CLL) und Chronisch Myeloische Leukämien (CML) (Pschyrembel, 2007; Tortora und Derrickson, 2008).

Als weitere Klassifikation der einzelnen Leukämieformen dient die Nomenklatur der „FAB“ (*French-American-British*). Aufgrund zytochemischer- und morphologischer Analysen sowie der Gliederung nach genetischen Aberrationen unterteilen sich ALL in die Subtypen L1-L3 und AML in die Subtypen M0-M7 (Pschyrembel, 2007). Die in der Klinik therapeutisch relevantere Einteilung der verschiedenen ALL-Typen erfolgt nach dem immunphänotypischen Erscheinungsbild der lymphatischen Blasten. Hierbei unterscheidet man B-Vorläufer-ALL (Prä-B-ALL, Pro-B-ALL, *common* ALL) von einer reifen B-ALL oder

einer T-Linien-ALL (Prä-T-ALL, Pro-T-ALL, kortikale T-ALL, reife T-ALL) (Bene *et al.*, 1995; Siegenthaler und Blum, 2006).

In der Klinik werden zudem die ICD-10 (*International Classification of Disease*)-Klassifikationen der WHO verwendet. Eine Erweiterung dieser Codierung umfasst die ICD-O-3 (*International Classification of Disease for Oncology*), welche gezielt die Tumorerkrankungen der Onkologie abdeckt. Dort werden durch Zahlencodes die Topographie, die Morphologie und das biologische Verhalten der Neoplasien eingeteilt. Des Weiteren werden Akute Leukämien aufgrund ihrer vorhandenen Oberflächenmarker mit Hilfe von EGIL „*European Group of the Immunological Characterization of Leukemias*“ klassifiziert. Speziell für die Abgrenzung der Biphänotypischen Leukämien von Akuten Leukämien kann diese Klassifikation verwendet werden. Akute Lymphatische Leukämien lassen sich hierbei aufgrund ihres Differenzierungsgrades als B- und T-Zell-Leukämien unterscheiden. Bei den Akuten Myeloischen Leukämien können über EGIL nur M0, M6 und M7 (FAB) unterschieden werden (Bene *et al.*, 1995; Vardiman *et al.*, 2002, www.who.int; www.dimdi.de).

Leukämien zählen zu den häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Akute Lymphatische Leukämien, mittlerweile im Deutschen Kinderkrebsregister (DKKR) als „Lymphatische Leukämie“ betitelt, stellen zudem bei den unter 18-Jährigen die größte Gruppe der in Deutschland verzeichneten Neuerkrankungen dar. Eins von 1.200 Kindern unter 15 Jahren erkrankt an einer Leukämie, wobei Jungen 20 % häufiger betroffen sind als Mädchen. Vor allem die akute und rasch verlaufende Form der Leukämie betrifft Kinder. Chronische Formen treten häufiger im Erwachsenenalter auf. Seit 1980 bis 2014 wurden allein 18.900 Leukämiefälle im Deutschen Kinderkrebsregister registriert, wobei hier von einer nahezu 100 %-igen Erfassung ausgegangen werden kann. Unter dieser Anzahl befinden sich 15.012 Lymphatische Leukämien und lediglich 2.653 AML. Die Überlebensrate nach 5, 10 und 15 Jahren liegt bei diesen AML etwa bei 70 %, wohingegen lymphatische Erkrankungen eine bessere Prognose aufweisen (89 %-92 %). Die in Abbildung 2 und in Abbildung 3 dargestellten Inzidenzen der zwischen den Jahren 2009-2014 bzw. 2005-2014 erfassten Erkrankungen der unter 18-Jährigen verdeutlichen die enorme Präsenz pädiatrischer Leukämien (Deutsches Kinderkrebsregister Mainz, Stand: Jahresbericht 2015).

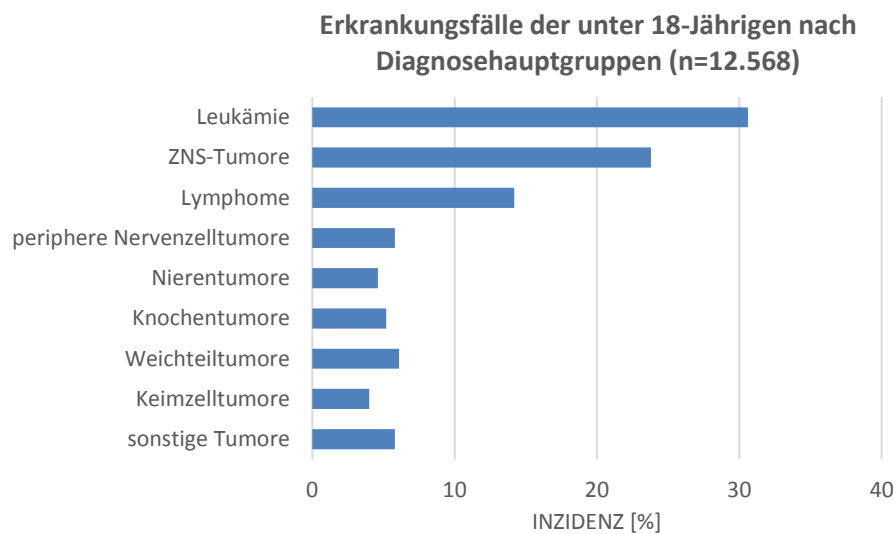


Abbildung 2: Relative Häufigkeit der an das DKKR gemeldeten Erkrankungen nach Diagnose-Hauptgruppen. Die Daten umfassen eine Erhebung der Jahre 2009-2014 der unter 18-Jährigen. Es wurden insgesamt 12.568 registrierte Patienten analysiert.

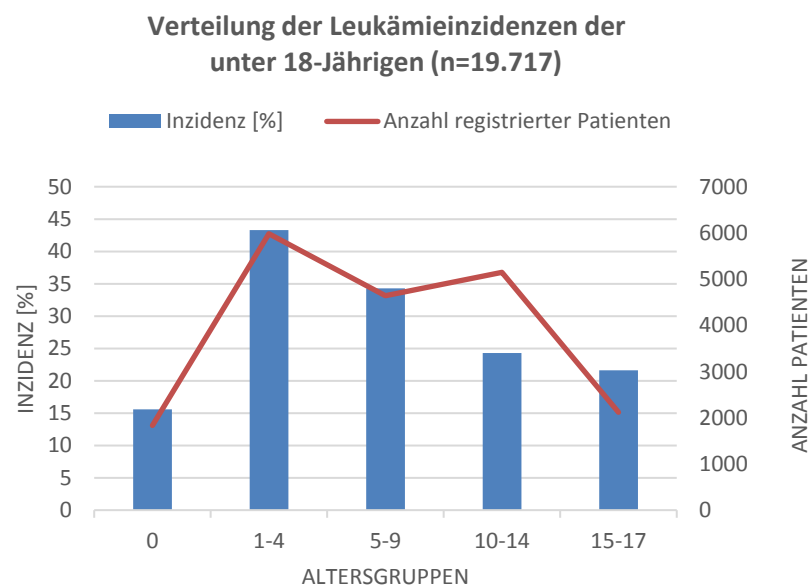


Abbildung 3: Verteilung der Leukämieinzidenzen der unter 18-Jährigen nach Altersgruppen. Prozentuale Verteilung der registrierten Leukämiepatienten und Anzahl der erfassten Patienten pro Altersgruppe. Die Daten umfassen eine Erhebung der Jahre 2005-2014 der unter 15-Jährigen und eine Erhebung der Jahre 2009-2014 der 15-18-Jährigen (n= 19.717).

1.3 Genetische Aberrationen und ihre Relevanz bei der Entstehung von Leukämien

Veränderungen der genetischen Information, sogenannte Mutationen, führen meist zu einem abnormalen Verhalten einer Zelle. Eine Transkriptionelle Dysregulation verursacht eine aberranten Verknüpfung von Proliferation und Migration bei bereits differenzierten bzw. quieszenten Zellen. Im Normalfall werden solche entartete Zellen durch das Immunsystem erkannt und eliminiert (wie in 1.1 beschrieben) oder in der Zelle werden Mechanismen eingeleitet, die Apoptose auslösen. Jedoch bleiben manche Mutationen vom Immunsystem oder der Zelle selbst unerkannt.

Befindet sich eine Mutation auf einem Chromosom, so spricht man von einer intra-chromosomalen Mutation. Sind beide Chromosomen von derselben Mutation betroffen, bezeichnet man dies als interchromosomale Mutation. Zudem unterscheidet man bei genetischen Aberrationen Deletionen, Inversionen, Duplikationen und Translokationen. Bei Ersterem gehen Bereiche eines Chromosoms verloren, wohingegen bei einer Inversion ein bestimmter Genabschnitt in seiner Reihenfolge geändert wird. Hierbei geht kein genetisches Material verloren, jedoch kann der invertierte Genabschnitt durch die Änderung des Genlocus unter den Einfluss eines anderen Kontrollmechanismus gelangen, sodass dies enorme Folgen für das Expressionsprofil der Zelle haben kann. Duplikationen beschreiben die Vervielfältigung eines bestimmten Chromosomenbereiches und Translokationen die Übertragung eines Chromosomenabschnitts auf ein anderes Chromosom (homolog oder nicht-homolog). Bei balancierten, reziproken Translokationen wird ein Chromosomenabschnitt auf ein nicht homologes Chromosom übertragen und die beiden nicht-homologen Bereiche der gebrochenen Chromosomen gegeneinander ausgetauscht. Das genetische Material geht zwar nicht verloren, befindet sich der neue Genlocus jedoch nicht in inertem Material, sondern in genetisch aktiven Bereichen, kann dies phänotypische Veränderung zur Folge haben. Da neben den beiden mutierten Chromosomen auch die beiden intakten Chromosomen Homologien zueinander aufweisen, kommt es während der Meiose zur Bildung eines Translokationskreuzes mit insgesamt vier Chromosomen. Die normale Segregation wird gestört und die Entstehung unbalancierter Chromosomensätzen begünstigt (Trisomie, Monosomie) (Munk, 2010).

Maligne Transformationen in pädiatrischen Leukämien können zwei Ursprünge haben. Zum einen eine Punktmutation, zum anderen einen DNA-Doppelstrangbruch, der wiederum zu einer chromosomalen Translokation, einer Deletion, einer Inversion oder einer Duplikation führen kann (Szczepański *et al.*, 2010). Das bekannteste Beispiel einer reziproken Translokation ist das Philadelphia-Chromosom. Diese $t(9;22)(q34;q11)$ -

Translokation löst eine CML aus, wobei durch das chimäre Protein BCR-ABL die Tyrosinkinaseaktivität des ABL-Proteins dauerhaft stimuliert wird. Es kommt zu einer ungehemmten Proliferation granulopoietischer Zellen und das hämatopoietische Gleichgewicht wird gestört (Klug *et al.*, 2007; Munk, 2010; Virgili *et al.*, 2008).

Meist unterliegen Leukämieerkrankungen einer Anhäufung mehrerer Aberrationen. Bei Translokationen des *MLL* (*mixed lineage leukemia*)-Gens ist dies jedoch nicht der Fall und der alleinige Zustand eines chimären MLL-Proteins reicht aus, um eine Leukämie auszulösen (Ayton und Cleary, 2001; Bursen *et al.*, 2010a; Szczepański *et al.*, 2010). WGS (*whole genome sequencing*)-Analysen bestätigten, dass MLL-r-basierte ALL bei Kleinkindern die niedrigste Rate an somatischen Mutationen aufweisen (Andersson *et al.*, 2015). Translokationen auf chromosomaler Ebene stellen häufig den Beginn einer Leukämogenese dar. Translokationen des *MLL*-Gens, die zu einer Leukämie führen, liegen meist einer nicht angemessenen Reparatur eines dsDNA-Bruchs während der Entwicklung hämatopoietischer Zellen zugrunde. Hierbei herrschen balancierte oder reziproke Translokationen vor (Reichel *et al.*, 1998a; Richardson und Jasin, 2000). Die entstandenen Fusionsgene, bzw. chimären Proteine, erlangen neue Eigenschaften und führen zu einer Dysregulation des hämatopoietischen Gleichgewichts. Bei pädiatrischen Leukämien, denen zum Beispiel MLL-AF4, TEL-AML1 oder AML1-ETO zugrunde liegt, findet die genetische Aberration meist *in utero* statt, sodass bereits die fötale Hämatopoiese gestört wird. Das ungeborene Kind wird durch die Disposition der Mutter mit Risikofaktoren gefährdet. Hier werden, neben den bereits oben beschriebenen Risikofaktoren einer Leukämieentstehung, Bioflavonoide, die gezielt *MLL*-Brüche bewirken können, oder maternale Expositionen mit Pestiziden und Dipyrone, diskutiert (Alexander *et al.*, 2001; Greaves und Wiemels, 2003; Strick *et al.*, 2000). Untersuchungen an eineiigen Zwillingen zeigten außerdem, dass diese, wenn ein *MLL*-Rearrangement während einer monochorialen Schwangerschaft vorliegt, eine Leukämie mit denselben Kloneigenschaften entwickeln (Greaves *et al.*, 2003).

Chromosomale Translokationen finden meist an sogenannten BCRs (*breakpoint cluster regions*) statt. Die Entstehung solcher Cluster haben zum einen mit der Sensitivität der Genregion für Doppelstrangbrüche zu tun, zum anderen finden dsDNA-Brüche mit hoher Wahrscheinlichkeit überall im Genom statt, jedoch bleiben nur diejenigen Aberrationen bestehen, die dem mutierten Klon einen Vorteil verschaffen. Hiervon sind vor allem aktive Gene mit offenem Chromatin betroffen (Greaves und Wiemels, 2003). Es werden drei verschiedene Gründe für die Auslösung von Doppelstrangbrüchen in der Literatur diskutiert. Dort gelten demnach die V(D)J-Rekombination, die Topoisomerase II und die Aktivität von apoptotischen Endonukleasen als relevante Auslöser (Betti *et al.*, 2003;

Broeker *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1993). Bei *MLL*-Brüchen spielen vor allem die letzten beiden Mechanismen eine große Rolle. Die Bruchpunktregion des *MLL*-Gens weist potentielle Bindestellen für Topoisomerasen II auf und der Bereich um Exon 9 ist hochsensibel für DNase I (Aplan *et al.*, 1996; Strissel *et al.*, 1998). Eine medikamentöse Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren (z.B. Etoposid, Teniposid) während einer Chemotherapie anderer Krebsarten, wurde ebenfalls als Auslöser für eine *MLL*-assoziierte Leukämie (t-AML bzw. t-ALL (t: *therapy related*)) bestätigt. Die Bruchpunkte waren hierbei gehäuft vor Exon 12 lokalisiert (Domer *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2009; Ratain *et al.*, 1987; Shearer *et al.*, 2001). Neueste Untersuchungen ergaben, dass durch den Replikationsstress einer Zelle eine Anhäufung der apoptotischen DNase Endonuklease G im Kern zu beobachten war, welche wiederum für die spezifische Spaltung des *MLL*-Gens innerhalb seiner BCR verantwortlich ist (Gole *et al.*, 2015). Durch homologe Rekombination oder NHEJ (*non-homologous end joining*) können Doppelstrangbrüche jedoch auch illegitim rekombiniert werden. NHEJ ist hierbei hauptsächlich für die Entstehung von Fusionsproteinen, wie *MLL*-AF4, *TEL*-*AML1*, *AML1*-*ETO* oder auch *PML*-*RAR α* , verantwortlich (Greaves und Wiemels, 2003; Rothkamm *et al.*, 2001).

1.4 Das *MLL* (*mixed-lineage-leukemia*)-Protein und seine Funktionen

Das *MLL*-Gen, oder auch *KMT2A* (*Histone-lysine N-methyltransferase 2A*)-Gen, ist das häufigste Ziel leukämieauslösender Translokationsereignisse und wird mit Hochrisikoleukämien assoziiert (Meyer *et al.*, 2013). Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 11q23 und codiert für eine Histonmethyltransferase, die Histon H3 an Lysin 4 methyliert (H3K4_{me2/3}). Diese Chromatinmodifikation stellt einen epigenetischen Marker für transkriptionell aktive Gene dar und wird in nahezu jedem Gewebe exprimiert (Krivtsov und Armstrong, 2007). Grundsätzlich übertragen Histonmethyltransferasen Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin auf die ϵ -Aminogruppe der Ziellysinreste (Guo und Guo, 2007). Epigenetische Veränderungen durch aberrante Histonmethyltransferaseaktivitäten führen zu einer veränderten Zellidentität und können so infantile und adulte Leukämien auslösen (Krivtsov und Armstrong, 2007; Liedtke und Cleary, 2009).

Das *MLL*-Gen kodiert für ein Protein mit 3.969 Aminosäuren, zählt zur Gruppe der TrxG (*thritorax groupe*)-Proteine und markiert durch seine H3K4-Methylierung der RNA-Polymerase II aktive Promotoren. Ihnen gegenübergestellt sind die PcG (*polycomb group*)-Proteine, die durch die vermittelte H3K9- (SUV39H1/2) und H3K27- (EZH1/2) Methylierung eine Stilllegung bestimmter Genbereiche initiieren (Saksouk *et al.*, 2015).

TrxG-Proteine sind hochkonservierte Regulatoren, die neben histonmodifizierenden Eigenschaften, die über SET-Domänen vermittelt werden, auch DNA-bindende Eigenschaften besitzen oder ATP-abhängige Chromatinmodulatoren darstellen. Alle drei Untergruppen (Trx, Trr und Set1) agieren mit einer großen Diversität an Komplexpartnern in Multimeren (Hess, 2004; Schuettengruber *et al.*, 2011).

Der Gruppe der KMT2-Proteine sind folgende vier Untereinheiten gemein: WDR5 (*WD repeat-containing protein 5*), RBBP5 (*retinoblastoma binding protein 5*), ASH2L (*absent, small, or homeotic-like*) und DPY30 (Dou *et al.*, 2006; Rao und Dou, 2015). Diese vier Untereinheiten bilden eine stöchiometrische Kerneinheit, die mit KMT2-Enzymen interagiert und deren Aktivität bis zu 500-fach verstärkt (Dou *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2009). Die katalytische SET-Domäne der KMT2-Proteine liegt direkt im Zentrum der RBBP5-WDR5 und ASH2L-DPY30 Paare und wird durch Interaktion mit der WDR5-RBBP5-ASH2L Kerneinheit konformationell geändert, sodass diese katalytisch aktiver ist (Dou *et al.*, 2006; Rao und Dou, 2015; Southall *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2011). WDR5 interagiert direkt mit KMT2A und vermittelt die Bindung zu RBBP5 über ein Val-Asp-Val-Motiv (Avdic *et al.*, 2011). *In vitro* löste eine Inhibierung dieser WDR5-KMT2A-Interaktion eine Verminderung der katalytischen Aktivität des KMT2A aus (Dharmarajan *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2008). Neben der Regulierung über die Kernkomponenten werden KMT2A/KMT2B auch über die Spaltung durch das Enzym Taspase1 reguliert. Die dadurch initiierte Proteolyse bedingt die Entstehung zweier Fragmente (MLL^N und MLL^C), die ein nicht-kovalentes Heterodimer bilden, welches die Aktivität und die Expression von Zielgenen des MLL beeinflusst (*HOXA1-4*) (Hsieh *et al.*, 2003). Jedoch belegten *in vivo*-Versuche mit einer unspaltbaren MLL-Proteinmutante in Mäusen auch, dass die Proteolyse erlässlich ist, um eine MLL-abhängige Genaktivierung und Proliferation zu erreichen. Lediglich die Unterbindung intramolekularer Interaktionen des MLL-Proteins führte zu einer vollkommenen Störung der Embryogenese (Yokoyama *et al.*, 2013).

Das MLL-Protein besitzt eine Vielzahl an Domänen und fungiert als Multiproteinkomplex (siehe Abbildung 4). Es dient hauptsächlich der Aufrechterhaltung der *HOX*-Genexpression während der Embryogenese und der Hämatopoiese (Hanson *et al.*, 1999). Von Yu *et al.* untersuchte *MLL*^{-/-}-Embryonen wiesen Misexpressionen ihrer *HOX*-Gene auf und zeigten Veränderungen ihrer Skelettformation, die noch *in utero* letal waren (Yu *et al.*, 1995). Am N-terminalen Teil des Proteins befinden sich zunächst drei AT-Haken, die mit AT-reicher DNA interagieren und so die Interaktion und die Bindung des MLL an spezifische DNA-Bereiche gewährleisten (Broeker *et al.*, 1996b). Eine ähnliche Aufgabe übernimmt die CXXC-Domäne, welche spezifisch an unmethylierte CpG-DNA bindet (Allen *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001). Neben der Rekrutierung des MLL-Proteins an aktive

Promotoren, konnte durch Deletions- und Mutationsversuche gezeigt werden, dass die CXXC-Domäne bei MLL-Fusionsproteinen für die Koloniebildung und Transformation von Knochenmark-zellen essentiell ist und die Leukämieentwicklung begünstigt (Ayton *et al.*, 2004; Cierpicki *et al.*, 2010). Zudem gewährleistet die Bindung des wt-MLL, respektive des Fusions-proteins, an sein Zielchromatin einen Schutz vor DNA-Methylierungen, um eine stetige Expression dieser Gene zu ermöglichen (Erfurth *et al.*, 2008). Zwischen AT-Haken und CXXC-Domäne befinden sich zwei SNL-Domänen (*speckled nuclear localization site*), von denen SNL1 den Transport des Proteins in den Kern ermöglicht (Yano *et al.*, 1997). Zwei wichtige Motive, die der Bindung des MLL-Proteins an das Chromatin seiner Zielgene verhelfen, sind das hMBM (*high-affinity menin binding motif*) und die LBD. Das hMBM befindet sich in den ersten 35 Aminosäuren des MLL und vermittelt die direkte Bindung zu MENIN1 (*multiple endocrine neoplasia type 1*) (Yokoyama *et al.*, 2005). Die LBD (*lens epithelium-derived growth factor binding domain*) befindet sich zwischen den Amino-säuren 112-153 und vermittelt die direkte Bindung zur p75-Isoform des LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*) (Yokoyama und Cleary, 2008). Beide Proteine sind wichtige Kofaktoren bei der Expression und Misexpression der MLL-Zielgene. Es konnte gezeigt werden, dass MENIN1 im Zusammenhang mit MLL-Fusionsproteinen als Adapter dient, um die p75-Isoform des LEDGF an MLL^N zu binden. Alle drei Proteine co-lokalisieren an MLL-Zielgenen. Durch eine Deletion der LBD waren MLL-ENL Mutanten nicht mehr in der Lage, eine myeloische Transformation zu vollziehen und *Hoxa9* zu exprimieren (Yokoyama und Cleary, 2008). Die konservierte PWWP-Domäne des p75/LEDGF-Proteins besitzt zudem die Fähigkeit, direkt an Chromatin zu binden (Botbol *et al.*, 2008). Das MLL-Protein wird posttranslational proteolytisch an zwei Positionen gespalten. Als Erkennung dienen hier die Schnittstellen (CS: *cleavage site*) CS1 (aa 2666/7) und CS2 (aa 2718/9), wodurch das Enzym Taspase1 das MLL-Protein in einen N-terminalen (MLL^N/N320) und einen C-terminalen Teil (MLL^C/C180) separiert. Über die homologen FYRN (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region n-terminal*) und FYRC (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region c-terminal*)-Domänen lagern sich die beiden Fragmente kovalent aneinander an und bilden ein funktionell aktives Heterodimer (Hsieh *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2002). Im N-terminalen Teil des MLL befinden sich zudem die beiden Repressionsdomänen RD1 und RD2. RD1 markiert den Bereich der zuvor beschriebenen CXXC-Domäne und besitzt die Fähigkeit, die beiden PcG (*polycomb-group*)-Proteine HPC2 und BMI-1, die unter anderem für die *HOX*-Gen-Reprimierung zuständig sind, sowie den Co-Repressor CtBP zu binden. Die zweite Repressionsdomäne RD2 rekrutiert die Histondeacetylase HDAC1 oder HDAC2 (Pirrotta, 1997; Xia *et al.*, 2003). *In vitro* konnte die reprimierende Funktion dieser beiden Histondeacetylasen mittels Trichostatin A (TSA), einem HDAC-Inhibitor, aufgehoben werden. Zudem konnte

für das wt-MLL gezeigt werden, dass eine zusätzliche Bindung des CYP33 an die PHD-Zinkfinger die Bindung von HDAC1 an die RD2 verstärkt (Xia *et al.*, 2003). Somit findet man innerhalb des MLL-Proteins sowohl reprimierende Faktoren der PcG-Proteine, als auch aktivierende Funktionen der Trx-Gruppe (SET-Domäne am C-terminalen MLL). Die PHD (*plant homology domain*) markiert den Bereich von vier Zinkfingermotiven. PHD3 und PHD4 werden durch eine Bromodomäne, die acetylierte Lysinreste erkennt, unterbrochen. PHD3 interagiert mit dem RNA-Erkennungsmotiv des CYP33 (Cyclophilin33), welches wiederum für die Reprimierung der MLL-Zielgene *HOXC8*, *HOXA9*, *CDKN1B* und *c-MYC* zuständig ist. Somit bedingt die An- bzw. Abwesenheit des CYP33 den reprimierenden bzw. aktivierenden Charakter des MLL-Proteinkomplexes (Ali *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2010). Die Transaktivierungsdomäne (TA) im C-terminalen Teil des MLL bindet die transkriptionellen Koregulatoren CBP (*CREB-binding protein*) und MOF (*Males Absent of the First*), die Histonacetyltransferasen darstellen (Bannister und Kouzarides, 1996; Dou *et al.*, 2005). Am C-terminalen Ende des MLL liegt die SET (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*)-Domäne, welche die Histonmethyltransferaseaktivität dieses Proteins vermittelt (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002, siehe auch Abbildung 4).

Unmethylierte CpG-Inseln (CGIs) markieren im Allgemeinen Promotoren von Säugerzellen und dienen als Signal für CXXC-Domänen, wodurch sie eine Akkumulation von H3K4_{me} fördern (Deaton und Bird, 2011). In der Literatur werden vier verschiedene Wege beschrieben, um eine MLL-assoziierte Interaktion mit CpG-reichen Sequenzen in Promotornähe zu erreichen. Diese ermöglichen die Aktivierung der Transkription durch die Rekrutierung von TrxG-Proteinen an Chromatin. So kann zum einen die CXXC-Domäne am N-terminalen Teil des MLL-Proteins eine direkte Interaktion mit nicht-methylierten CpG-Inseln der DNA gewährleisten, zum anderen kann das MLL auch über Proteininteraktionen mit Transkriptionsfaktoren oder dem PAF1 (*polymerase-associated factor 1*) an die Promotorbereiche herangeführt werden (Muntean *et al.*, 2010; Voo *et al.*, 2000). Eine dritte Variante stellt eine recht neue Form dar, bei der lncRNAs (*long non-coding RNA*) Enhancerfunktionen übernehmen können. Es konnte gezeigt werden, dass HOTTIP RNA (*HOXA transcript at the distal tip*), eine nicht kodierende RNA des 5'-Endes des *HOXA*-Locus, mit dem WDR5-Protein des MLL-WDR5-Komplexes interagiert und somit das MLL-Protein in unmittelbare Nähe der *HOXA*-Promotoren bringt, um deren Histone zu modifizieren (Wang *et al.*, 2011). Zudem führen bereits bestehende Histonmodifikationen zu einer Rekrutierung von TrxG-Proteinen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass H3K4_{me2} und auch H3K4_{me3} das MLL über die Bindung der PHD-Zinkfingerdomäne an den *HOXA9*-Promotor rekrutiert (Milne *et al.*, 2010).

Das MLL-Protein dient somit der gewebespezifischen Aktivierung bestimmter Promotoren, um eine adäquate Embryogenese und Hämatopoiese, durch Aufrechterhaltung der embryonalen *HOX*-Genexpression, zu gewährleisten. Während Differenzierungsprozessen ist diese spezifische *HOX*-Genaktivierung jedoch nicht mehr zu finden (Milne *et al.*, 2005a; Nakamura *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2004). MLL bindet seine Zielgene nicht nur an den Promotorbereichen, sondern co-lokalisiert mit der RNA Polymerase II über das gesamte Gen (Milne *et al.*, 2005a). Unter den Zielgenen des MLL befinden sich, neben den Genen des *HOX*-Clusters, auch transkriptionelle Regulatoren, wie z.B. die des extrazellulären und intrazellulären Wnt-Signalweges (z.B. DKK3, FRAT2, SFRP1/2). Des Weiteren werden auch Transkriptionsfaktoren wie Egr3, Pax9, Foxc1 durch eine Deletion des murinen *Mll*-Gens beeinflusst (Wang *et al.*, 2009).

Histonmodifikationen sowie DNA-Methylierungsmuster teilen das Genom in aktive und inaktive Bereiche, wodurch jede Zelle ihr eigenes, spezifisches Epigenom generiert und diese Muster an Tochterzellen vererbt (Rao und Dou, 2015). Bei diesem Prozess spielt die KMT2-Familie eine übergeordnete Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass KMT2A und sein *D. melanogaster* Homolog *Trx* während der DNA-Replikation und Mitose an der DNA gebunden bleibt und somit den transkriptionellen Zustand bewahrt. Hierdurch wird die epigenetische Vererbung von Chromatinmodifikationen an Tochterzellen sichergestellt (Blobel *et al.*, 2009; Petruk *et al.*, 2012). Während des Zellzyklus, in der G1/S- und der M/G1-Phase, wird KMT2A durch die E3 Ubiquitin Ligasen SCF (*SKP1-CUL1-F-box protein*) und APC/C (*anaphase-promoting complex*) abgebaut (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Das Wildtyp-MLL besitzt in seiner PHD2-Domäne ebenfalls eine E3 Ubiquitin Ligase Aktivität, welche bei den Fusionsproteinen nicht mehr vorhanden ist und somit zu einem „Turnover“ des MLL-X-Levels führt (Wang *et al.*, 2012). Der makromolekulare MLL-Komplex dient somit der Koordination von Chromatinmethylierungen und der Nukleosomenumgestaltung (Slany, 2009).

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Funktionsstörung von TrxG- oder auch PcG-Proteinen zu einer aberranten Genexpression führt und somit die Initiierung einer Tumorgenese begünstigen kann (Sparmann und van Lohuizen, 2006).

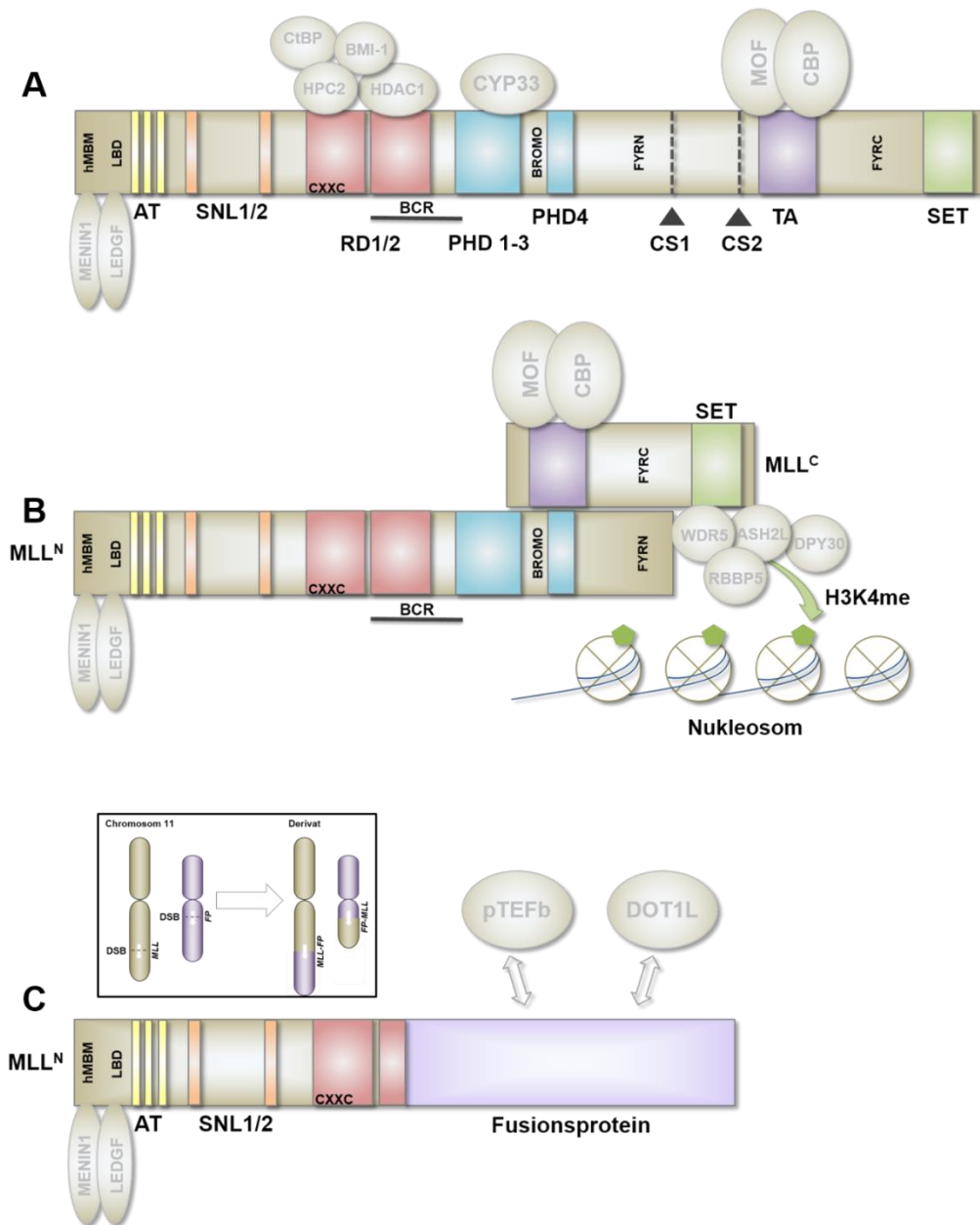


Abbildung 4: Schematische Darstellung des MLL-Proteins mit seinen funktionellen Domänen. (A) Das unprozessierte wt-MLL mit seinen assoziierten Proteinen und funktionellen Domänen: hMBM (humanes MENIN1-Bindemotiv); LBD (LEDGF-Bindedomäne), AT-Haken (AT), *speckled nuclear localization side* (SNL1/2), Repressionsdomäne (RD1/2), Zinkfinger (PHD1-4), Schnittstellen der Taspase1 (CS1/2), Transaktivierungsdomäne (TA), Histonmethyltransferase-vermittelnde SET (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*)-Domäne. Die Bruchpunktregion (BCR) definiert den Bereich mit den häufigsten dsBrüchen des *MLL*-Gens. (B) Die Hydrolyse durch das Enzym Taspase1 separiert das MLL-Protein an den Schnittstellen CS1 und CS2 in zwei funktionelle Teile, dem 320 kDa schweren MLL^N und dem 180 kDa schweren MLL^C. Die beiden Fragmente lagern sich über die homologen FYRN- und FYRC-Domänen als Heterodimer zusammen. Die SET-Domäne vermittelt eine H3K4_{me} an den Nucleosomen spezifischer Zielgene. (C) Chimäres MLL-Protein mit dem N-terminalen MLL-Teil. Je nach Fusionsprotein können DOT1L-basierte Komplexe (DotCom) oder pTEFb-basierte Komplexe (SEC, EAP, AEP) rekrutiert werden (siehe Abbildung 6). Die eingerahmte Abbildung verdeutlicht schematisch die Begebenheiten einer chromosomalen Translokation des Chromosoms 11 (FP: Fusionspartner, DSB: Doppelstrangbruch).

1.4.1 MLL-Translokationen im Kontext einer Leukämie und die Rolle assoziierender Komplexe des chimären MLL-Proteins

Etwa 10 % aller Leukämiefälle sind charakterisiert durch die Anwesenheit eines rearrangierten *MLL*-Gens (Marschalek, 2011). Die Doppelstrangbrüche des *MLL*-Gens treten gehäuft zwischen Exon 9 und Exon 11 auf (siehe BCR in Abbildung 4, Kapitel 1.3., Meyer *et al.*, 2009). Nur 3,8 % von 1.530 untersuchten MLL-Translokationen besaßen ihren Bruchpunkt außerhalb dieser Bruchpunktregion (Meyer *et al.*, 2013). Durch Translokationsereignisse des *MLL*-Gens besitzt das chimäre MLL^N-Fusionsprotein weiterhin die Fähigkeit über AT-Haken, hMBM und LBD an die Zielgene des wt-MLL zu binden. Es fehlt jedoch u.a. die H3K4_{me}-vermittelnde SET-Domäne. Umgekehrt besitzen die chimären Proteine mit dem MLL^C-Teil die histonmodifizierende Fähigkeit der SET-Domäne, jedoch wird diese nicht mehr zielgerichtet an MLL-Zielgenpromotoren ausgeübt (Mohan *et al.*, 2010b, siehe Abbildung 4).

Nur etwa 40 % aller *MLL*-Mutationen führen zu einer trunkierten MLL-Form. Zudem bleibt meist das zweite *MLL*-Allel intakt. ShRNA-basierte *knockdown*-Versuche und auch Deletionen des Wildtyp-*MLL* in MLL-r-basierten Leukämien zeigten in *in vivo*-Versuchen, dass dieses Gen für die Tumorgenese essentiell ist. MLL-AF9 transformierte Zellen wiesen nach der Deletion des wt-MLL ein vermindertes Wachstum auf. Bei Mäusen konnte durch die Zugabe von KMT2A-depletierten Zellen keine MLL-AF9-induzierte Leukämie ausgelöst werden (Thiel *et al.*, 2010). Durch die positive Regulierung von Zellzykluskomponenten, wie CDKN1B, CDKN2A und CDKN2C (*cyclin dependent kinase inhibitor*), trägt das wt-MLL ebenfalls zur Zelltransformation bei (Milne *et al.*, 2005b; Xia *et al.*, 2005).

In Leukämien besitzen die MLL-Fusionsproteine eine hohe Diversität. Bis heute wurden über 80 verschiedene Partnergene des MLL charakterisiert, die direkt, also *in frame*, fusioniert sind (Meyer *et al.*, 2013 und unpublizierte Daten des *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL) Frankfurt a.M). Das häufigste Partnergen ist das *AF4*-Gen, welches bei etwa 36 % aller MLL-r diagnostiziert wurde. 57 % aller ALL-Patienten weisen eine t(4;11)-Leukämie auf. Die Verteilung reicht hier von 49 % bei Kleinkindern bis zu etwa 80 % bei Erwachsenen. Die meisten ALL-Neuerkrankungen (etwa 79 %) werden im Alter zwischen null und einem Jahr verzeichnet und sind ebenfalls durch MLL-Rearrangements charakterisiert (Marschalek, 2011; Meyer *et al.*, 2013). Neben dem *AF4*-Gen findet man bei ALL-Patienten auch Fusionen mit anderen Genen, wie *AF9*, *ENL*, *AF10*, *ELL* und *AF6*. Den größten Anteil nehmen hierbei *AF4*, *AF9* und *ENL* mit etwa 88 % aller ALL-Fälle ein. Bei Kleinkindern (<1 Jahr) weisen etwa 49 % aller ALL-Patienten das MLL-AF4

Fusionsprotein auf. Bei AML Erkrankungen ist mit 25 % aller MLL-r Leukämien das AF9-Partnergen involviert (unpublizierte Daten des *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL) Frankfurt a.M, Stand: Januar 2017, siehe Abbildung 5).

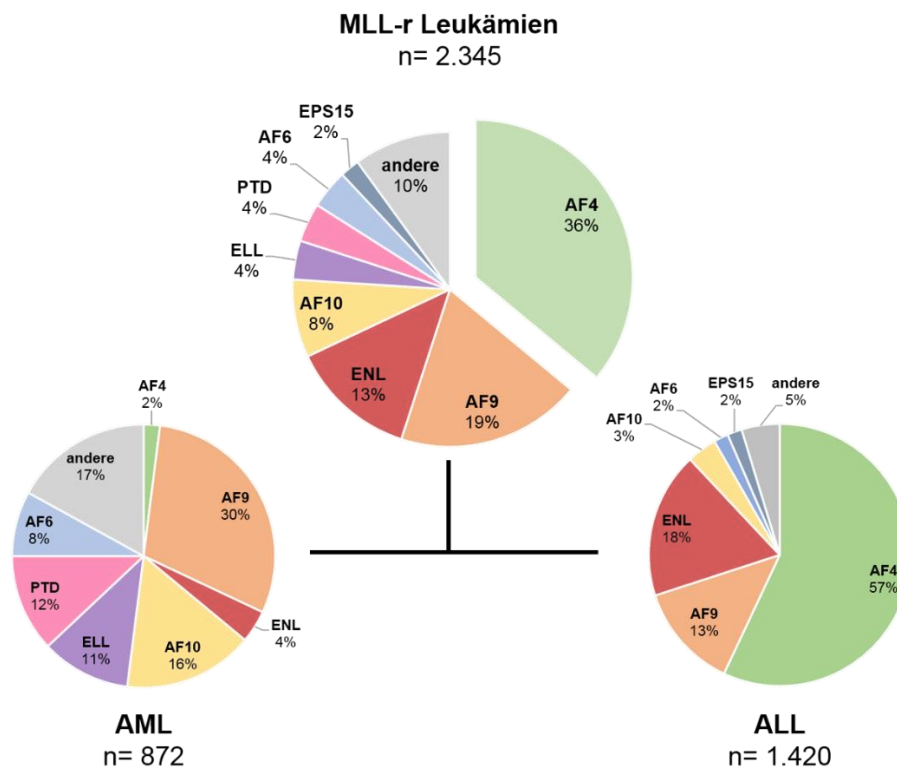


Abbildung 5: Klassifikation der Leukämietypen und Fusionspartner. Insgesamt wurden 2.345 Leukämiepatienten bezüglich ihres Typus und des fusionierten Partnergens eingeteilt. Das häufigste Partnergen bei ALL stellt AF4 dar. Bei AML ist AF9 das prominenteste Partnergen. (unpublizierte Daten des *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL) Frankfurt a.M, Stand: Januar 2017).

Akute Lymphatische Leukämien bei Kleinkindern werden als aggressiv und schwer behandelbar eingestuft (*high-risk*). Die Prognosen sind hierbei sehr schlecht und die Behandlungsprotokolle beinhalten oft die Gabe von poly-Chemotherapien. Diese Protokolle stützen sich auf Interfant-06, welches aufgrund des Alters, der Leukozytenanzahl (WBC: *white blood count*) und dem Vorhandensein von MLL-Translokationen die Akuten Lymphatischen Leukämien in *low-*, *medium-* oder *high-risk* einteilen. *High-risk*-Patienten sind demnach unter 6 Monate alt, sprechen auf eine initiale Behandlung mit Prednison nicht an, haben eine WBC von über 300.000/ μ l und weisen ein rearrangiertes MLL auf (www.kinderkebsinfo.de: Interfant-06). Das Vorhandensein von *RAS*-Mutationen, hohen Leveln von *FLT3* und einer geringen *HOXA*-Expression führen ebenfalls zu einer

schlechten Prognose von ALL-Patienten (Chillón *et al.*, 2012; Driessen *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2007, 2010; Trentin *et al.*, 2009).

MLL-Fusionspartner stellen membranassoziierte sowie nukleäre oder zytoplasmatische Proteine dar. Sie beeinflussen Prozesse wie die transkriptionelle Elongation, Endozytose, Apoptose oder steuern Chromatinmodifikationen und Signaltransduktionswege (Meyer *et al.*, 2009). Die chimären Proteine binden direkt oder indirekt chromatinmodifizierende Proteine, wie TrxG, PcG, HATs oder HDACs (Dou *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2003). Sie können jedoch auch multimere, biochemische Komplexe binden, die mit ihnen assoziiert sind. Man unterscheidet hierbei vier verschiedene Typen: den EAP-Komplex (*elongation associated proteins*), den AEP-Komplex (*AF4/ENL/pTEFb complex*), den SEC (*super elongation complex*) und den DotCom (*DOT1L associated protein complex*) (siehe Abbildung 6).

Die häufigsten MLL-Fusionspartner stellen EAP (*elongation-associated proteins*)-Komplexbpartner dar. Die EAP-Komplexbpartner interagieren mit der RNA Polymerase II, PAF1C, DOT1L, pTEFb, BRD4 und CBX8-TIP60, was das chimäre Protein dazu befähigt, hohe Expressionsraten zu generieren und die transkriptionelle Elongation zu beeinflussen (Jo *et al.*, 2011; Milne *et al.*, 2010; Muntean *et al.*, 2010; Okada *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2011; Yokoyama *et al.*, 2010). Die Kerneinheit des EAP-Komplexes besteht aus den drei Proteinen ENL, AF4 und pTEFb, sodass durch das Vorhandensein weiterer Faktoren eine hohe Variabilität an EAP-Komplexen entsteht (Deshpande *et al.*, 2012).

Der SEC bindet neben den drei Elongationsfaktoren ELL1-3, EAF1/2 und pTEFb auch AFF4, AFF1 (AF4) und AF9/ENL und stimuliert die Transkription (Lin *et al.*, 2010). Die Elongationsfaktoren ELL (*eleven-nineteen Lys-rich leukemia*) stellen in diesem Zusammenhang, neben AF4, einige der häufigsten Zielgene für reziproke Translokationsereignisse mit dem MLL dar, wodurch eine direkte Assoziation zwischen diesen Genen und einer Leukämieentstehung besteht. Die Aufgabe der ELL-Proteine ist es, das Pausieren der Pol II nach 30-40 nt hinter dem TSS (*transcription start site*) zu verhindern. Dadurch gewährleisten sie eine stetige Transkription der Zielgene (Luo *et al.*, 2012; Shilatifard *et al.*, 1996). AF4 stimuliert die RNA-Polymerase II-abhängige Transkriptionselongation und vermittelt eine Chromatinstrukturierung. Es fungiert als positiver Regulator des p-TEFb und vermittelt eine Rekrutierung des Dot1 (Bitoun *et al.*, 2007). Der pTEFb-Komplex beinhaltet die katalytische Untereinheit CDK9 und die regulatorische Einheit CyclinT1 bzw. CyclinT2. Dieser Komplex phosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II und reguliert den Übergang zwischen Transkriptionsinitiation und Transkriptionselongation. Durch zusätzliche Phosphorylierung der negativen

Elongationsfaktoren NELF und DSIF dissoziiert NELF von der pausierten Pol II und induziert die Elongation (Luo *et al.*, 2012; Peterlin und Price, 2006). In genomweiten Chromatin-Immünpräzipitationsstudien konnte gezeigt werden, dass der SEC speziell für die schnelle Transkriptionsinduktion essentiell ist. An embryonalen Stammzellen der Maus konnte nach Zugabe von Retinsäure eine vermehrte Rekrutierung des SEC an die Promotoren responsiver Gene wie *Hoxa1* und *Cdx1* festgestellt werden (Lin *et al.*, 2011). Zudem rekrutiert der SEC in Zelllinien mit einer t(4;11)-Translokation BRD4 (*Bromodomain-containing protein 4*) (Dawson *et al.*, 2011). Über die Bromodomäne des BRD4 wird das Fusionsprotein an acetylierte Histone herangeführt, was die Transkription der Gene beeinflusst (Wu und Chiang, 2007).

Der DotCom beinhaltet neben DOT1L die Faktoren AF10, AF17, SKP1, TRRAP und AF9/ENL und vermittelt über DOT1L eine H3K79 Methylierung der Zielgene (Mohan *et al.*, 2010b). H3K79 Mono- und Dimethylierungen sind Signale für aktive Transkriptionsbereiche, eine Trimethylierung signalisiert reprimierte Gene (Wong *et al.*, 2015). Der SEC wird von allen MLL-Fusionspartnern rekrutiert, die ebenfalls Komponenten des SEC darstellen. Dadurch wird er an den MLL-Zielgenen stabilisiert und es kommt zu einer aberranten Expression von z.B. *HOXA9* und *HOXA10* und zur Entstehung aggressiver Leukämien (Luo *et al.*, 2012). In den Fällen, bei denen das chimäre Proteine ENL oder AF9 beinhaltet, können sogar beide Komplexe, der SEC und der DotCom, co-rekrutiert werden (Mohan *et al.*, 2010a). Aber auch bei MLL-AF4 Translokationen konnte zum einen eine Interaktion mit DOT1L und der Ausführung ektooper H3K79_{me} nachgewiesen, zum anderen aber auch eine Interaktion des reziproken Teils mit der pTEFb-Kinase festgestellt werden (Benedikt *et al.*, 2011; Krivtsov *et al.*, 2008). AF4 initiiert durch die Rekrutierung dieser beiden Faktoren die aberrante Expression von MLL-Zielgenen und induziert die Leukämogenese, denn eine DOT1L-vermittelte H3K79_{me2/3} ist z.B. bei dem MLL-AF4-Onkogen notwendig für die Expression der *HOXA*-Gene (Krivtsov *et al.*, 2008). DOT1L-*knockouts* in Mäusen bestätigten zudem, dass die Initiierung und die Aufrechterhaltung einer MLL-AF9-basierten Leukämie von DOT1L abhängig ist (Nguyen *et al.*, 2011).

Der AEP-Komplex besteht aus den Proteinen AF4, ENL, pTEFb oder AFF4 (AF5q31), ENL, pTEFb und bildet MLL/AEP-Hybride mit MLL-Fusionspartnern, die ebenfalls Proteine des AEP-Komplexes darstellen. Sie co-lokalisierten in ChIP-Versuchen an Zielgenen des MLL, steigerten die Expression dieser Gene und ermöglichten die Transformation hämatopoietischer Vorläuferzellen (Yokoyama *et al.*, 2010).

Einige Proteine der vier Komplexe beinhalten direkte Fusionspartner des MLL, wodurch eine Bindung an chimäre MLL-Proteine möglich wird. Auch das Vorhandensein von Unter-

einheiten der Transkriptionselongationsmaschinerie, wie des pTEFb, verdeutlichen die enorme Auswirkung dieser assoziierten Komplexe auf das Expressionsprofil einer mutierten Zelle (Deshpande *et al.*, 2012).

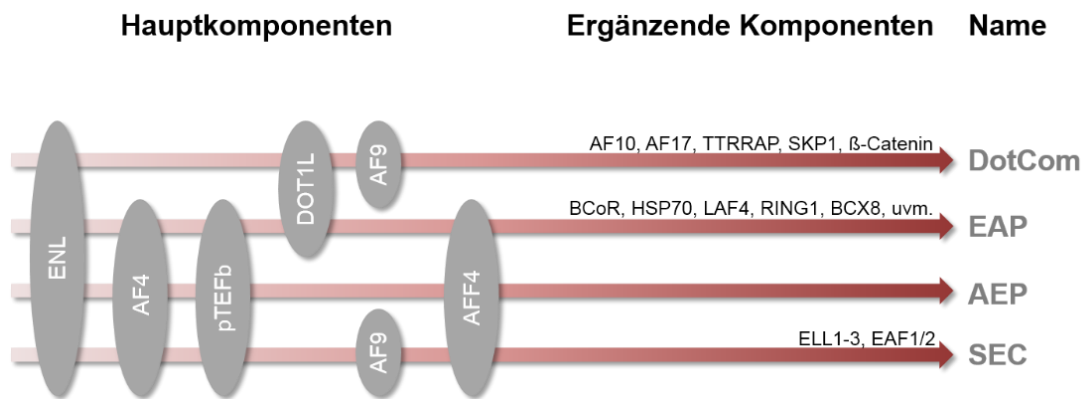


Abbildung 6: Auflistung der Komplexe und Komponenten, die mit den MLL-Fusionspartnern assoziiert sind. Man unterscheidet vier verschiedene multimere Komplexe: den DotCom (DOT1L associated protein complex), den EAP (*elongation-associated proteins*), den AEP (AF4/ENL/pTEFb complex) und den SEC (*super elongation complex*) (modifiziert nach Deshpande *et al.*, 2012).

Neben diesen vier Komplexen, die an den C-terminalen, fusionierten Teil der MLL-r binden, sorgt der PAF-Komplex (PAFc) dafür, dass der N-terminale MLL-Teil korrekt an seine Zielgene herangeführt wird und aktiviert die transkriptionelle Aktivität über eine Interaktion mit der RNA Polymerase II. Er besteht aus den Proteinen PAF1, LEO1, CDC73, CTR9, RTF1 und SKI8. PAFc bindet wt-MLL und MLL^N direkt über die CXXC- und RD2-Domänen und fördert dadurch zusätzlich die Transformationsfähigkeit von Knochenmarkzellen (Muntean *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2005). Die onkogene Wirkung der chimären MLL-Proteine lässt sich jedoch nicht nur durch den Erwerb einer transkriptionellen Aktivierung erklären, denn auch mit zytoplasmatischen Fusionspartnern, die *per se* keine nukleären Funktionen besitzen, ist das rearrangierte MLL in der Lage, Leukämien auszulösen. Der Grund wird in der Fähigkeit der Dimerisierung der Fusionsproteine gesehen. Ein prominentes Beispiel sind GAS7 und AF1p, bei denen die Oligomerisierung zu einem onkogenen MLL führt, die *HOX*-Zielgene aktiviert und die Selbsterneuerung hämatopoietischer Progenitorzellen fördert. Zudem konnte in *knockin*-Mausmodellen durch eine Fusion des *Mll* an *lacZ*, welches in aktivem Zustand Tetramere bildet, eine lymphatische und eine myeloische Leukämie ausgelöst werden (Dobson *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; So *et al.*, 2003). Somit wird bei den chimären Proteinen der Erwerb

neuer Fähigkeiten als Auslöser der Leukämien gesehen, was bedeutet, dass auch nicht-pathogene Fusionsproteine zur Tumorgenese führen können.

Neben den MLL^N-assoziierten Fusionspartnern ist auch der reziproke Teil mit MLL^C fähig, eine Leukämie auszulösen. *In vivo*-Versuche bestätigten, dass z.B. AF4-MLL alleine eine pro-B ALL induzieren kann. Hierbei rekrutiert AF4-MLL ebenfalls regulatorische Modulatoren, wie den RNA-Protein-Komplex pTEFb und fungiert als RNA Polymerase II-Aktivator, da es die transkriptionelle Elongation steigert. Zudem wird durch Hydrolyse des AF4-MLL durch das Enzym Taspase1 die proteosomale Degradation dieses Proteins unterbunden, sodass das reziproke Fusionsprotein als nicht abbaubare Version des AF4 positiv auf die RNA-Polymerase II einwirkt und so ebenfalls zu malignen Prozessen führen kann (Benedikt *et al.*, 2011; Bursen *et al.*, 2010a). Durch das Vorhandensein beider Fusionsproteine, MLL-AF4 und AF4-MLL, ist es nicht verwunderlich, dass die t(4;11)-Leukämie zu den aggressivsten MLL-r-basierten Leukämien zählt. Das EFS (*event free survival*) von Kleinkindern nach 4 Jahren liegt bei 17-18 % und bei den unter 3-Monatigen bei etwa 5 % (Felix *et al.*, 2000; Hess, 2004).

Untersuchungen von ALL-Patientenmaterial ergaben, dass bei einer 11q23-Translokation etwa 1.000 Gene reprimiert und etwa 200 Gene aktiviert werden (Armstrong *et al.*, 2002). Auf der Basis von Genexpressionsprofilen zeigte sich zudem, dass sich MLL-basierte Leukämien gänzlich von den sonstigen Akuten Myeloischen- oder Akuten Lymphatischen Leukämien unterscheiden. ALL exprimieren typischerweise lymphatische Gene wie *MME*, *CD24*, *DNTT* und *LIG4*. AML exprimiert myeloische Gene wie *DF*, *CTSD* und *ANPEP*. MLL-assoziierte Leukämien weisen hingegen keine erhöhte Expression dieser Gene auf. Ihr GEP ist durch die Expression typischer Gene, die in hämatopoietischen Progenitorzellen vorliegen, wie z.B. *PROML1*, *LMO2*, *FLT3*, gekennzeichnet (Armstrong *et al.*, 2002). MLL-assoziierte ALL besitzen im Vergleich zu ALL-Patienten, die kein MLL-Rearrangement aufweisen, ein spezifisches Genexpressionsprofil. Vor allem die Überexpression von *HOXA9*, *HOXA5* und *HOXA4* ist charakteristisch. *MEIS1*, von dem bekannt ist, dass es eine *HOXA9*-abhängige Transformation beschleunigt, ist ebenfalls überexprimiert. *HOXA9*-depletierte AML- und ALL-Zelllinien weisen einen Proliferationsstop und eine erhöhte Apoptoserate auf, was die Relevanz dieses Gens beim Voranschreiten dieser Leukämien verdeutlicht (Faber *et al.*, 2008; Rozovskaia *et al.*, 2001).

HOX-Deregulierungen stellen den wichtigsten Mechanismus der MLL-r-induzierten Leukämogenese dar. Neben der Embryonalentwicklung kontrollieren die *HOX*-Gene die Differenzierung hämatopoietischer Zellen. Eine hohe *HOX*-Genexpression ist typisch für

Stammzellen und frühe Vorläuferzellen. Die Reifung der Blutzellen ist jedoch charakterisiert durch eine geringe *HOX*-Expression. Somit führt eine kontinuierliche, aberrante *HOX*-Expression, wie sie bei Zellen mit MLL-Fusionsproteinen häufig zu finden ist, zu einem Differenzierungsblock und zu einer Population sich selbst teilender Vorläuferzellen (Ernst *et al.*, 2004; Horton *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 2005c; Slany, 2009). Weiterhin induziert das MLL durch die von ihm vermittelte H3K4_{me}-Histonmodifikation direkt die Expression der *HOX*-Gene (Milne *et al.*, 2002).

1.5 Die *HOX*-Gene und ihre funktionellen und regulatorischen Aufgaben

Die *HOX* (Homöobox)-Gene des Menschen sind eine Klasse hochkonservierter Transkriptionsfaktoren, die Homologe der homöotischen Gencluster in *Drosophila* darstellen. Die jeweils vier humanen bzw. murinen *HOX*-Cluster (Cluster A-D) umfassen 39 Gene. Die Loci der Cluster befinden sich auf vier verschiedenen Chromosomen, *HOXA* (7p14), *HOXB* (17q21), *HOXC* (12q13) und *HOXD* (2q31), und beinhalten zwischen neun und elf Gene. Basierend auf ihrer Homologie und ihrer Lage innerhalb der jeweiligen Cluster werden sie in 13 paraloge Gruppen unterteilt (Mark *et al.*, 1997; Veraksa *et al.*, 2000, siehe Abbildung 7). Man geht davon aus, dass etwa 200 Homöoboxgene im menschlichen Genom existieren, die u.a. in den Homöoboxgen-Clustern *MSX*-, *PAX*-, *SIX*-, *LIM*- oder *IRX* zu finden sind (Abate-Shen, 2002; Tupler *et al.*, 2001).

HOX-Gene steuern die Zellidentität während der Embryogenese und determinieren die Bildung des axialen Skeletts, des Metencephalons und der Extremitäten sowie die Körpersegmentierung entlang der anterior-posterior Achse und Prozesse der Organentwicklung. Sie werden in Zellen des hämatopoietischen Systems und in leukämischen Zellen mit myeloischem oder lymphatischem Ursprung exprimiert. In differenzierten Geweben kontrollieren sie die Homöostase und Zelldifferenzierung. Während der Differenzierung und der Reifung von Blutzellen ist ihre Expression reprimiert (Abate-Shen, 2002; Argiropoulos und Humphries, 2007; Javed und Langley, 2013; Kelly *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2005; Veraksa *et al.*, 2000). Eine Deregulierung der *HOX*-Gene ist nicht nur in Leukämien, sondern auch bei Prostata-, Lungen-, Ovarial- und Mammakarzinomen zu finden (Shah und Sukumar, 2010).

Die *HOX*-Transkriptionsfaktoren aktivieren oder reprimieren ihre Zielgene durch Interaktion mit ihrer DNA-Bindedomäne, der Homöodomäne, in Exon 2. Diese 60 Aminosäuren umfassende Domäne vermittelt die sequenzspezifische Bindung an DNA-

Elemente, die ein TAAT oder ATTA Kernmotiv beinhalten (Pearson *et al.*, 2005; Shah und Sukumar, 2010). Es sind in der Literatur etwa 35 direkte Zielgene der *HOX*-Gene in verschiedenen Organismen beschrieben, wie z.B. die Aktivierung des murinen RAR- β durch *Hoxb4* und *Hoxd4* oder eine Regulierung des humanen *EphB4* durch *HOXA9* (Bruhl *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 2005; Serpente *et al.*, 2005). Die funktionellen Einheiten der *HOX*-Proteine können neben Monomeren auch Homodimere oder Heterodimere/-trimere darstellen. Die ersten beiden Molekülverbände binden direkt an ihre Zielgene und beeinflussen deren Transkription. Die dritte und vierte Variante kombinieren die *HOX*-Proteine mit Transkriptionsfaktoren der TALE (*three amino acid loop extension*)-Familie und bewirken eine Regulierung der Zielgene. (Abate-Shen, 2002; Shah und Sukumar, 2010; Veraksa *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass z.B. *HOXD4* an *CBP* (*CREB binding protein*) bindet, was in einer Inhibierung der HAT-Aktivität des *CBP* resultiert und somit dessen Zielgene, wie z.B. *TWIST1*, reprimiert (Shen *et al.*, 2001). Jedoch konnte eine Interaktion mit Proteinen, wie z.B. *SMAD*, auch zu einer Inhibierung der *HOX*-Aktivität führen (Li *et al.*, 2006).

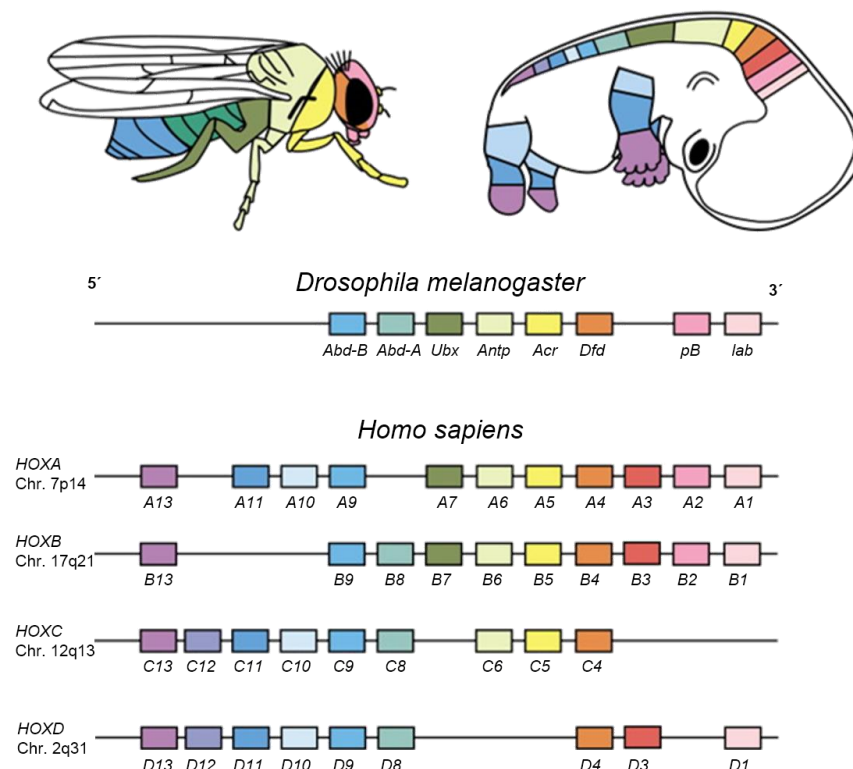


Abbildung 7: Schematische Darstellung der *HOX*-Cluster bei *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*. Im humanen System existieren insgesamt 39 *HOX*-Gene, die in vier Cluster auf vier Chromosomen verteilt sind und entlang ihrer 5' →3' Orientierung die posterior-anterior Achse während der Embryogenese determinieren. Innerhalb der vier Cluster lassen sich 13 paraloge Gruppen klassifizieren (modifiziert nach Goodman, 2003).

Eine aberrante *HOX*-Genexpression ist vor allem bei verschiedenen Krebsarten von hoher Relevanz. Abate-Shen postulierte hierzu drei verschiedene Mechanismen, die zu einer Deregulierung der *HOX*-Gene in entarteten Zellen führen können. Die prominenteste Kategorie beschreibt die „re-Expression“ der *HOX*-Gene. Hierbei findet eine *HOX*-Genexpression zu einem anderen Zeitpunkt statt, als sie normalerweise in diesem Gewebe vorkommt. Zwar wurde eine *HOX*-Genexpression z.B. während der Differenzierung bzw. der Embryogenese in diesen Zellen ausgeführt, ist jedoch für den Zeitpunkt der „re-Expression“ abnormal. Die zweite Kategorie beschreibt die „Gendominanz“, bei der die betroffene Zelle eine *HOX*-Expression aufweist, obwohl eine solche Expression zu keinem Zeitpunkt für dieses Gewebe vorgesehen war. Man nennt dies auch „ektopy“ Genexpression. In der letzten Kategorie spricht man von „epigenetischer Deregulierung“, da die *HOX*-Gene zu einem Zeitpunkt herunterreguliert bzw. stillgelegt werden, zu dem sie normalerweise exprimiert werden sollten. Hier fungieren die *HOX*-Gene als Tumor-Suppressoren, wohingegen in den ersten beiden Kategorien eine Deregulierung der *HOX*-Gene direkt mit der Tumorgenese in Verbindung steht (Abate-Shen, 2002; Shah und Sukumar, 2010).

Modifizierungen der Histonmethylierungen durch TrxG-Proteine, respektive durch Komponenten des PRC2 (*polycomb repression complex 2*), steuern die *HOX*-Expression (Hanson *et al.*, 1999). Die Transkriptionsregulierung kann jedoch auch über nicht-kodierende RNAs erfolgen, wie HOTAIR (*hox transcript antisense intergenic RNA*), welche die PRC2 an *HOX*-Gene rekrutiert oder microRNA, welche posttranskriptionell das Level der *HOX*-Gene reguliert (z.B. mir-196b via MLL-Aktivierung) (Popovic *et al.*, 2009; Rinn *et al.*, 2007).

1.5.1 Assoziation der *HOX*-Genexpression mit der Entstehung verschiedener Leukämien

Neben Prozessen der Apoptose, der Differenzierung und der Invasion, beeinflussen *HOX*-Gene auch die Proliferation. Gerade bei Leukämien bedingt eine aberrante *HOX*-Expression das Proliferationsverhalten. Das Fusionsprotein NUP98-HOXA9 wies bei AML-Patienten eine positive Beeinflussung der Proliferationsrate durch Aktivierung von *MEIS1* und *CREB1* auf. Eine co-Expression von NUP98-HOXA9 und Meis1 in transplantierten Mäusen verkürzte die Zeit der AML-Entwicklung von 230 Tage auf 142 Tage (Kroon *et al.*, 2001). Neben der Beeinflussung der Proliferation von AML-Zellen signalisierte eine hohe Rate an z.B. *HOXA9* in leukämischen Blasten eine ungünstige Prognose hämatopoietischer Malignitäten (Golub *et al.*, 1999). *HOXA9* band in

Kombination mit PBX2 oder MEIS1 an die DNA und eine Überexpression des Homöoboxgens führte *in vitro* zur Immortalisierung myeloischer Progenitorzellen (Calvo *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 1999). *Hoxa9*- und *Meis1*-Überexpressionen in transduzierten Knochenmarkzellen führten zu einer AML und einer vermehrten Proliferation myeloischer Zellen (Kroon *et al.*, 1998). *Hoxa7* und/oder *Hoxa9* beeinflussten die Latenzzeit und den Phänotyp von Akuten Myeloischen Leukämien, waren jedoch für die Initiierung einer AML erlässlich (Faber *et al.*, 2008; So *et al.*, 2004). HOXB10 störte die myeloische und lymphatische Differenzierung in hämatopoietischen Zellen von Mäusen und führte zu einer AML (Thorsteinsdottir *et al.*, 1997). RNA-Sequenzierungsdaten an MLL-X-basierten AML-Zellen (n=179) zeigten im Vergleich zu gesunden CD34⁺-Stammzellen, dass AML-Zellen keine Überexpression ihrer HOXA- (*HOXA3-10*) und HOXB- (*HOXB2-6*) Cluster aufweisen, sondern das Level der gesunden CD34⁺-Progenitorzellen beibehalten. Mit höherem Reifungsgrad, also von CD34⁺ bis hin zu promyeloischen und reifen myeloischen Zellen, nahm die Expressionsrate der HOXA- und HOXB-Cluster ab (Spencer *et al.*, 2015). Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen einer schlechten Prognose von AML-Patienten und der Produktion der HOXA3-HOXA10 sowie der TALE-Proteine PBX3 und MEIS1 (Drabkin *et al.*, 2002).

Eine Deregulierung der HOX-Gene spielt auch bei T-ALL und B-ALL eine wichtige Rolle. So zeigten T-ALL mit einem TCR β -HOXA oder einem CALM-AF10 Fusionsprotein eine komplette Dysregulation der HOXA-Gene, was eine Verknüpfung der HOX-Expression mit der Entstehung von Leukämien vermuten lässt (Soulier *et al.*, 2005; Speleman *et al.*, 2005). Bei 11q23-translozierten ALL ist eine Überexpression der Gene *HOXA4*, *HOXA5* und *HOXA9* charakteristisch. Im Vergleich zu normalen ALL ist das *MEIS1*-Gen in MLL-X-assoziierten ALL ebenfalls meist überexprimiert. Es wurde jedoch bereits als Kofaktor der HOX-Gene beschrieben und im Zusammenhang mit der Auslösung einer t(4;11)-Leukämie mit überexprimiertem *HOXA9* genannt (Armstrong *et al.*, 2002; Rozovskaia *et al.*, 2001). In MLL-ENL-basierten T-ALL und MLL-r-basierten B-ALL liegen *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXC6* sowie *MEIS1* jeweils überexprimiert vor (Ferrando *et al.*, 2003). Bei t(4;11)-ALL-Patienten ist charakteristischerweise eine Überexpression der *HOXA3*-, *A4*-, *A5*-, *A6*-, *A9*- und *A10*-Gene über GEP nachgewiesen worden (De Braekeleer *et al.*, 2012; Rozovskaia *et al.*, 2001).

Die Expression der HOX-Gene *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9* und *HOXA10* ist sowohl bei AML als auch bei ALL mit einer MLL-Translokation hochreguliert. *HOXA11* und *HOXA6* sind in AML am stärksten überexprimiert (Zangrando *et al.*, 2009). Bis auf *HOXA2* und *HOXA5* führt die Überexpression der HOXA-Gene zu einem Block der hämatopoietischen Differenzierung (Bach *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass *MLL-AF4*

exprimierende humane ESC (*embryonic stem cell*) im Vergleich zu ESC eine um 88,9 % erhöhte Expression aller *HOX*-Gene aufweisen können. Darunter befand sich auch das prominente MLL-Zielgen *HOXA9*. Das Level der ektopen *MLL-AF4*-Expression entsprach hierbei dem der Leukämiezelllinien SEM und RS4;11 und die transduzierten Zellen wiesen dieselben funktionellen und phänotypischen Eigenschaften wie ihre Kontrollzellen auf: Die Expression von Pluripotenzmarkern wie *Oct4*, *Nanog* und hESC, typischen Antigenen wie Tra-1-60, Tra-1-81 und SSEA-3/4 sowie die Fähigkeit zur Bildung von Teratomen (Bueno *et al.*, 2012).

Generell weisen MLL-r-assoziierte Leukämien eine *HOX*-Gen-Deregulierung auf, die mit einer schlechten Prognose einhergeht, sodass sie durch ihr Genexpressionsprofil klar von anderen ALL oder AML abgegrenzt werden können. Vor allem die Überexpression von *HOXA9* und *MEIS1* ist charakteristisch (Armstrong *et al.*, 2002; Rozovskaia *et al.*, 2001; Yeoh *et al.*, 2002).

Im Kontext der Hämatopoese und der Leukämie sind *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXB4* am besten untersucht. *HOXA9* reguliert die Hämatopoese und fungiert als Onkogen. Hierbei aktiviert es Pim1, welches einen Einfluss auf die Proliferation hat und die BAD-Proteine inaktiviert (Hu *et al.*, 2007). *HOXA9* ist das Homöoboxgen mit der schwerwiegendsten Beeinflussung des hämatopoietischen Phänotyps. *HOXA9* wird in primitiven hämatopoietischen Zellen exprimiert und während Differenzierungsphasen herunterreguliert (Lawrence *et al.*, 1997). In kompetitiven Repopulationsversuchen wiesen *Hoxa9*^{-/-}-Mäuse nach einer Bestrahlung die größte Beeinträchtigung der Repopulationsfähigkeit ihrer HSCs auf (Lawrence *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu *Hoxb3*^{-/-}- bzw. *Hoxb4*^{-/-}-knockout-Phänotypen, wies *Hoxa9* einen hochregulatorischen Effekt in HSCs auf, beeinflusste die Differenzierung und führte zu Leukämien (Argiropoulos und Humphries, 2007; Thorsteinsdottir *et al.*, 2002). Die Überexpression von *Hoxa9* in murinen, transgenen E2A-PBX1 B-Zellen beschleunigte die Bildung einer Leukämie, jedoch war *Hoxa9* alleine nicht fähig, B-Zellen zu transformieren (Hassawi *et al.*, 2013). Durch direkte Bindung aktivierte *Hoxa10* die Expression von Genen (z.B. *Fgf2*, *Tgfβ2*), die zu einer Expansion myeloischer Progenitorzellen führte (Shah *et al.*, 2011, 2012). Eine *HOXA10*-Überexpression beeinflusste die myeloische und B-lymphatische Differenzierung und induzierte in Mäusen innerhalb von 19-50 Wochen eine AML (Thorsteinsdottir *et al.*, 1997).

Einen enormen Einfluss auf die Selbsterneuerungs- bzw. Expansionsrate hämatopoietischer Stammzellen hatte die *in vitro*- und *in vivo*-Überexpression des Transkriptionsfaktors *HOXB4* (Sauvageau *et al.*, 1995). Hämatopoietische Stammzellen halten die Produktion aller Blutzellbestandteile durch Expansion und Selbsterneuerung während der

Embryogenese und des hämatopoietischen Stresses aufrecht (Argiropoulos und Humphries, 2007). HOXB4-transduzierte, murine Knochenmarkzellen waren weiterhin fähig, *ex vivo* lymphatische und myeloische Vorläuferzellen zu generieren (Antonchuk *et al.*, 2002). HOXB4 führte zu einer Expansion primitiver HSC ohne deren Differenzierung zu beeinflussen (Buske *et al.*, 2002). Eine retrovirale Überexpression von *HOXB4* in knochenmarktransplantierten Mäusen zeigte eine 1.000-fache Anreicherung der transduzierten HSC im Vergleich zu Kontrollzellen (Antonchuk *et al.*, 2002). Zusammengefasst dient HOXB4 der Regeneration von HSC und HOXA9/HOXA10 führen jeweils alleine oder in Kombination zu myeloischen oder lymphatischen Leukämien (Kroon *et al.*, 1998; Sauvageau *et al.*, 1995, 1997; Thorsteinsdottir *et al.*, 1997). Eine definierte Expression bestimmter *HOX*-Gene scheint demnach für eine normale Hämatopoiese notwendig zu sein und eine Störung dieses Gleichgewichts kann enorme Folgen haben.

Die *HOX*-Gene und auch die *HOX*-Fusionen, wie NUP98-*HOX*, spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungsstatus während der Hämatopoiese bzw. Leukämogenese. Welcher *HOX*-basierte Mechanismus jedoch zur Initiierung von Leukämien in HSC oder Progenitorzellen führt, ist weitgehend ungeklärt.

HOX-Gene sind wichtige prognostische Faktoren bei Leukämien, vor allem bei AML. Dort geht eine Überexpression des *HOXA9*-Gens mit einer hohen Rezidivrate und einer schlechten Prognose einher, wohingegen AML mit geringen Levels an *HOXA9* die beste Prognose aufweisen und gut auf Chemotherapien ansprechen (Andreeff *et al.*, 2008; Golub *et al.*, 1999). In t(4;11)-ALL wurde eine Patientengruppe beschrieben, die im Gegensatz zu den bisher üblichen *HOXA*-Überexpressionen (hier *HOXA5*, *A9*, *A10*) eine geringere bis keine Expression der *HOXA*-Gene aufwies. Das GEP dieser *HOXA*^{low}-Patienten korrelierte mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Rezidivrate. Diese Patientengruppe beinhaltete pädiatrische Patienten, deren BCR zwischen Intron 11 und Intron 12 lag, wohingegen die *HOXA*^{high}-Gruppe von adulten Patienten mit einer BCR in Intron 9 und Intron 10 dominiert wurde. Die Genexpressionsprofile der pädiatrischen *HOXA*^{low}-Patientengruppe wiesen zudem alle eine Überexpression des Transkriptionsfaktors IRX1 (Iroquois1) auf (Stam *et al.*, 2010; Trentin *et al.*, 2009). Die Zellen der untersuchten *HOXA*^{low}/*IRX1*^{high}-Patienten wiesen zudem alle RAS-, KRAS- und NRAS-Mutationen auf (Trentin *et al.*, 2016). Des Weiteren zeigte eine Untersuchung von Kleinkindern mit MLL-AF4-assoziierten Leukämien, dass eine Expression von *IRX2*, *EPS8* und *TPD52* im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose stehen kann. Gemäß Kang *et al.* können MLL-AF4-Patienten generell in zwei heterogene Gruppen eingeteilt werden: (1) Die „*HOX*-Gruppe“, mit einer Überexpression einiger *HOX*-Gene und (2) die „*IRX*-Gruppe“, die eine Überexpression von *IRX1* und *IRX2* aufweist (Kang *et al.*, 2012). Somit

scheint es neben der gängigen *HOXA*-Überexpression in t(4;11)-basierten Leukämien einen alternativen Mechanismus zu geben, der die Leukämogenese dieser ALL induziert bzw. aufrechterhält. Hierbei scheint der Transkriptionsfaktor IRX1 bzw. IRX2 eine besondere Rolle einzunehmen.

1.6 Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren des IRX-Clusters

Die *Iroquois*-Transkriptionsfaktoren stellen Homologe der *Drosophila*-Gene *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*) des Iro-Komplexes dar. In duplizierter Form findet man im humanen System zwei Cluster mit je drei Genen (Gomez-Skarmeta *et al.*, 1996; McNeill *et al.*, 1997). Der *IRXA*-Cluster befindet sich auf Chromosom 5 und impliziert die Gene *IRX1*, *IRX2* und *IRX4*. Der *IRXB*-Cluster auf Chromosom 16 umfasst die übrigen drei *IRX*-Gene. Zudem lassen sich innerhalb der zwei Cluster drei paraloge Gruppen definieren, welche in ihrer Orientierung und Lage innerhalb des Clusters identisch sind (siehe farbige Gruppierung in Abbildung 8, Bosse *et al.*, 2000; Cavodeassi *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2000). Die *IRX*-Gene bzw. die IRX-Proteine weisen strukturelle und sequenzspezifische Homologien in ihrer Homöodomäne (HD) auf. Diese zählen aufgrund der drei Aminosäuren-Verlängerung zur Gruppe der TALE-Proteine. Zudem besitzen alle eine konservierte Iro-box, deren 13 Aminosäuren große Kernsequenz stark mit dem EGF-Motiv der Notch-Rezeptoren übereinstimmt (Cavodeassi *et al.*, 2001; Gomez-Skarmeta *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2012; McNeill *et al.*, 1997). IRX-Proteine binden ihre Zielgene sequenzspezifisch über ihre Erkennungssequenz ACAnnTGT, welche auch als IBS (*Iro binding site*) bezeichnet wird (Bilioni *et al.*, 2005).

In Vertebraten determinieren *Irx1-Irx4* verschiedene Stadien der Embryogenese, wie die Strukturierung und die Formierung des ZNS, des Herzens und der Extremitäten (Bosse *et al.*, 1997; Bruneau *et al.*, 2000). Im murinen System befinden sich die beiden Genloci der *IRX*-Cluster auf den Chromosomen 8 und 13 (Peters *et al.*, 2000). Die räumliche Verteilung der sechs murinen *Irx*-Gene in E12 Mausembryonen zeigte, dass *Irx1*, -2, -3 und -5 ähnliche Expressionsgebiete, wie das Gehirn, die Extremitäten und das Neuralrohr, aufwiesen, wohingegen *Irx4* hauptsächlich im Herzen, in der Haut und im Metencephalon exprimiert wurde. *Irx1* und *Irx2* hatten im Vergleich zu allen anderen *Irx*-Genen eine hohe Übereinstimmung ihrer Expressionsgebiete (Houweling *et al.*, 2001).

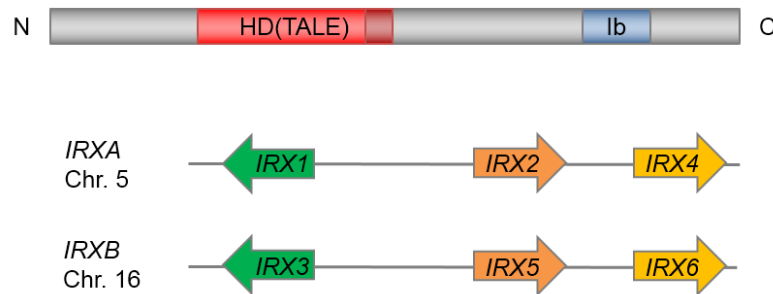


Abbildung 8: Schematische Darstellung des humanen IRX-Clusters. Alle IRX-Proteine beinhalten am N-terminalen Teil eine Homöodomäne, die bei TALE (*three amino acid loop extension*)-Proteinen um drei Aminosäuren verlängert ist. Am C-terminalen Teil befindet sich die Iro-box, die dem zentralen Part des EGF-Motivs der Notch-Rezeptoren ähnelt. Die IRX-Gene befinden sich in zwei Clustern zu je drei Genen, die drei paraloge Gruppen bilden (modifiziert nach Kim *et al.*, 2012).

1.6.1 Krebserkrankungen im Kontext einer IRX-Deregulierung

Die Datenlage der ektopten oder der aberranten IRX-Expression in malignen Erkrankungen ist minimal. Die beiden *Iroquois*-Transkriptionsfaktoren IRX1 und IRX2 werden, wie bereits in 1.5.1 beschrieben, in Leukämien dereguliert und dienen dort als Klassifikationsmarker zur Einteilung verschiedener t(4;11)-Patientengruppen und als prognostische Faktoren für die Vorhersage des Krankheitsverlaufs (Kang *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2010; Trentin *et al.*, 2009, 2016). Kennzeichnend für Magenkrebs und Plattenepithelkarzinome des Kopfes und des Halses (HNSCC: *head and neck squamous cell carcinoma*) ist die Inaktivierung des IRX1-Gens, die durch ein LOH (*Loss of Heterozygosity*) und eine Methylierung der CGIs der Promotorregion des IRX1 hervorgerufen wird. Eine Infektion der Zelllinien GES-1 (epitheliale Magenkarzinomzellen) mit *Helicobacter pylori* initiierte denselben Effekt, wodurch auch hier eine verminderte IRX1-Expression der infizierten Zellen detektierbar war. (Bennett *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010, 2011; Lu *et al.*, 2005). In HNSCC-Zellen führte eine Deregulierung von IRX1 zu einer Beeinflussung des TGF β -Signalweges und zu einer Modulation der Mitose- und der Apoptoseaktivität (Bennett *et al.*, 2009). In Magengeschwüren fungierte IRX1 als Tumor-Suppressor-Gen. Zudem führte die Aufhebung der IRX1-Suppression zu einer verminderten Wachstumsrate, einer verminderten Invasionsfähigkeit und einer verminderten Tumorgenese. Die hypermethylierte IRX1-DNA konnte sogar im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen werden, was IRX1 als potentiellen Biomarker für Magenkarzinome interessant macht. Microarray-Analysen in GES-1-Zellen identifizierten drei direkte Zielgene des IRX1: *FGF7*, *HIST2H2BE* und *BDKRB2*, welche für die Regulierung der Angiogenese, Zellproliferation und Invasion zuständig sind (Guo *et al.*,

2010). Die Reprimierung der *IRX1*-Expression in Magenkarzinom-Zellen konnte *in vitro* durch die Expression der micro-RNA miR-544 imitiert werden, was zu einer Steigerung der Proliferationsrate und zu einer Progression des Zellzyklus führte (Zhi *et al.*, 2013). Die *in vitro*-Expression von *IRX1*, und folglich die Inhibierung von *BDKRB2*, verminderte die Angiogenese und den Mechanismus der vaskulären Mimikry in HUVEC- und SGC-7901-Zellen (Jiang *et al.*, 2011). Eine *IRX1*-Hypomethylierung in Osteosarkomen stellte ebenfalls einen potenziellen molekularen Marker dar. Eine Überexpression des *IRX1* korrelierte mit einer Hypomethylierung seines Promotors. Eine Suppression dieser Genexpression resultierte in einer Reduktion der Invasions- und Migrationsfähigkeit der Zellen (Lu *et al.*, 2015). Aberrante DNA-Methylierungen des *IRX1* und einiger *HOX*-Gene zeigten sich auch in Zellen von Brustkrebs- und Prostatakrebspatienten, was hier ebenfalls den Fokus auf die Etablierung neuer Biomarker oder Therapeutika lenkte. In Rhabdomyosarkomen korrelierten hypermethylierte CGIs des *IRX1* mit der Pathogenese dieses bösartigen Weichteiltumors (Day und Bianco-Miotto, 2013; Mahoney *et al.*, 2012).

Eine Überexpression von *IRX2* in Osteosarkomen führte zu einer AKT-abhängigen Erhöhung von *MMP2*, *MMP9* und *VEGF*, was in einer gesteigerten Proliferation und einer verstärkten Invasionsfähigkeit dieser Zellen resultierte (Liu *et al.*, 2014a, 2015). Einige Brustkarzinome waren durch eine *IRX2*-Überexpression charakterisiert und korrelierten zudem mit einem schnellen Fortschreiten der Erkrankung (Kadota *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 1999). Neueste Forschungen zeigten im Zusammenhang mit primären Mammakarzinomen, dass eine erhöhte *IRX2*-Menge in den Zellen die Motilität unterdrückte und die Expression von Metastasen-fördernden Chemokinen wie *CCL5*, *CXCL9-11* verminderte, was *IRX2* zu einem Marker der Metastasierung macht (Werner *et al.*, 2015). In Lungenkarzinomen wurden aber auch epigenetische Hypermethylierungen der *IRX2*-Promotoren beschrieben (Rauch *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2014). Neben einer deregulierten Expression fand man z.B. in Weichteilsarkomen häufig auch Amplifikationen des Chromosoms 5p und hier im Speziellen des *IRX2*-Gens, was ausschlaggebend für den Fortschritt der Erkrankung war (Adamowicz *et al.*, 2006). Squamöse Lungenkarzinome wiesen im Gegensatz zu normalen Lungengewebe in nahezu allen Proben Methylierungen der CpG-Inseln einiger Homöobox-Gene, wie *PAX6* und *IRX2*, auf. Diese könnten zukünftig in der Diagnostik als frühe Detektionsmarker eines Lungenkarzinoms dienen (Rauch *et al.*, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass *IRX3* und *IRX5* bei der Transition von Adenomen zu Karzinomen die Sensitivität von CRC (*colorectal cancer*)-Zellen auf Zytostatika reduzieren können und den Zellen somit einen Wachstumsvorteil hin zu Krebszellen verschaffen (Martorell *et al.*, 2014). *IRX3* war zudem in Leberzellkarzinomen überexprimiert und

förderte die Proliferation, die Migration und die Invasion von SMMC7721-Zellen (Wang *et al.*, 2016). In Hirntumoren wurde eine bis zu 8-fache Erhöhung der IRX3-Menge detektiert (Ordway *et al.*, 2006). In einer weiteren Studie hemmte IRX4 das Wachstum von Prostatakarzinomzellen und wirkte über Interaktionen mit dem Vitamin-D-Rezeptor als Tumor-Suppressor (Nguyen *et al.*, 2012).

Die IRX-Transkriptionsfaktoren determinieren frühe Prozesse der Embryogenese und sind im Zusammenhang mit Malignitäten wenig beschrieben. Eine Expression in hämatopoietischen Geweben ist atypisch und kann weittragende Folgen für entartete Zelle haben.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Präsenz der chimären Proteine MLL-AF4 und AF4-MLL steht vor allem bei Kleinkindern in Zusammenhang mit Hochrisikoleukämien, die aufgrund rapider Krankheitsverläufe, hoher Aggressivität und hoher Rezidivrate mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte konnten den Wirkmechanismus der MLL-AF4-basierten Akuten Lymphatischen Leukämien bis heute nicht komplett entschlüsseln. Eine gestörte Expression der MLL-Zielgene durch die t(4;11)-Translokationsprodukte wurde jahrelang als auslösender Mechanismus der Leukämieentstehung angesehen. Vor allem die *HOX*-Expression ist hierbei in den Fokus der Forschungen gerückt. Eine Überexpression bestimmter *HOXA*-Gene fungiert sogar als molekularer Marker für die Klassifizierung verschiedener Leukämiearten.

Als Grundlage dieser Doktorarbeit dienten die Arbeiten von Trentin *et al.*, der bei den Untersuchungen von t(4;11)-Patienten auf ein neues Expressionsmuster gestoßen ist. Hiervon waren vor allem pädiatrische Patienten betroffen, die im Gegensatz zu adulten Patienten keine *HOX*-Deregulierung aufwiesen. Er betitelte diese Patientenkohorte als *HOXA*^{low}-Patienten. Bei Genexpressionsanalysen dieser Kohorte identifizierte man weitere Gene, die im Gegensatz zu den bisher bekannten *HOXA*^{high}-Patienten ein differenziertes Expressionsverhalten aufwiesen. Interessanterweise korrelierte die Expression des Transkriptionsfaktors Iroquois1 (*IRX1*) mit einer fehlenden Deregulierung der *HOXA*-Gene (*HOXA*^{low}). Die Expression dieses Transkriptionsfaktors und seines Homologs *IRX2* korrelierte zudem in weiteren Analysen von t(4;11)-Patienten mit einer schlechten Prognose, im Gegensatz zu *HOXA*^{high}-Patienten (Kang *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2010; Trentin *et al.*, 2009). Vorangegangene Arbeiten, wie die Bachelorarbeit mit dem Titel „Identifizierung von direkten und indirekten *IRX1* Zielgenen“ (Alessa Gramlich, 2011) und die Masterarbeit „Transkriptionelle Repression von *HOX*-Genen durch den Homöobox-Transkriptionsfaktor *IRX1*“ (Alessa Gramlich, 2013) legten bereits den Grundstein der Erforschung von *IRX1* und *IRX2* im Zusammenhang mit MLL-AF4-assoziierten Leukämien.

Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse einer ektope *IRX1*- und *IRX2*-Überexpression der t(4;11)-basierten Leukämie nachzustellen und den molekularen Mechanismus hinter der negativen Beeinflussung der *HOXA*^{low}/*IRX*^{high}-Genotypen auf den Verlauf der Erkrankung aufzuklären. Hierzu wurde die Expression des *IRX1* und *IRX2* in HEK293T-Zellen sowie in leukämischen SEM-Zellen durch die Benutzung der neuesten Generation der induzierbaren *Sleeping Beauty*-Konstrukte imitiert. Durch diese Vektoren ist eine Integration der GOIs in das Genom der Zellen möglich, wodurch eine gemäßigte ektope

Expression dieser Gene erreicht werden kann. Die stabil transfizierten Zellen dienen als Grundlage für die Beobachtungen molekularer Interaktionen von IRX1/2 auf Protein- und DNA-Ebene. Die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeiten wurden in weiteren Systemen validiert und durch Co-Immunpräzipitationen, Chromatin-Immunpräzipitationen sowie RT-PCR-Analysen und weiteren molekularbiologischen Methoden erweitert. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A sollte zudem eine Aussage darüber getroffen werden, welchen Effekt diese Art von Inhibitoren auf die regulatorischen Mechanismen der MLL-AF4-basierten Leukämie hat und ob IRX1 die Reaktion der Zellen auf Inhibitoren dieser Gruppe als potenzielle Arzneistoffe beeinflusst.

2 ERGEBNISSE

2.1 Vorarbeiten zu diesem Thema

Die molekularen Mechanismen, die mit der Beeinflussung der t(4;11)-basierten Leukämie und der zusätzlichen Expression des Transkriptionsfaktors IRX1 in Verbindung stehen, sind bisher kaum erforscht. Als Grundlage dieser Doktorarbeit dienten meine vorangegangene Bachelor- und auch Masterarbeit, die thematisch direkt aufeinander aufbauen.

In der Bachelorarbeit wurden zunächst HEK293T-Zellen transient mit dem *IRX1*-Gen transfiziert (*IRX1::GFP*). Die positiv transfizierten, grün fluoreszierenden, Zellen wurden am FACS aussortiert und deren Genexpressionsprofil über Affymetrix HG-U133Plus 2.0 DNA-Microarrays im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten (*GFP*) Zellen untersucht. Hierbei wurden insgesamt 8.400 Gene in der Anwesenheit von IRX1 dereguliert (GEO Acc. No. GSE75376). Abbildung 9 verdeutlicht, dass unter den um mindestens das 4-fache deregulierten Genen, neben Signaltransduktionsmediatoren und apoptoserelevanten Genen, vor allem die Expression von Transkriptionsfaktoren (22 %) beeinflusst wurde (siehe Abbildung 9A). Bei der Auswertung der arbiträren Lichteinheiten der DNA-Microarray-Daten in Bezug auf die *MEIS*-, *PBX*- und *HOX*-Cluster, zeigte sich, dass IRX1 eine Reprimierung der Gene dieser Cluster, ausgenommen des *HOXC*-Clusters, verursacht (siehe Abbildung 9B). Diese ersten Ergebnisse der *IRX1*-Überexpression ließen die Vermutung zu, dass IRX1 für die Reprimierung der typischen *HOXA*-Überexpression in t(4;11)-Patienten verantwortlich sein könnte.

In der daran angeschlossenen Masterarbeit wurden die Ergebnisse der Bachelorarbeit z.T. validiert, jedoch war es bis dahin noch nicht möglich, eine gleichbleibende Menge an *IRX1 in vitro* zu exprimieren, was zu einer Schwankung der Effekte aufgrund unterschiedlicher *IRX1*-Mengen führte. Mit der Etablierung der ersten Generation der *Sleeping Beauty*-Konstrukte konnten diese Schwankungen zum größten Teil behoben werden. Doch hierbei zeigte sich, dass der induzierbare Promotor noch eine recht hohe Basaltranskription aufwies und das Konstrukt generell mit einer zu hohen Kopienzahl in das Genom integriert wurde. Dies resultierte in einer unphysiologischen Menge des GOI in den Zellen. Mit diesen ersten stabilen Transfektionen konnte jedoch der reprimierende Effekt des IRX1 auf *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA9* und *MEIS1* bestätigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass der aktivierende Effekt des MLL-AF4 in co-Transfektionen von IRX1 und MLL-AF4 nicht zum Tragen kommt. Dies spricht dafür, dass IRX1 über den Effekt des MLL-AF4 dominiert und direkt in den Mechanismus der MLL-AF4-basierten Expression der *HOX*-Gene involviert ist.

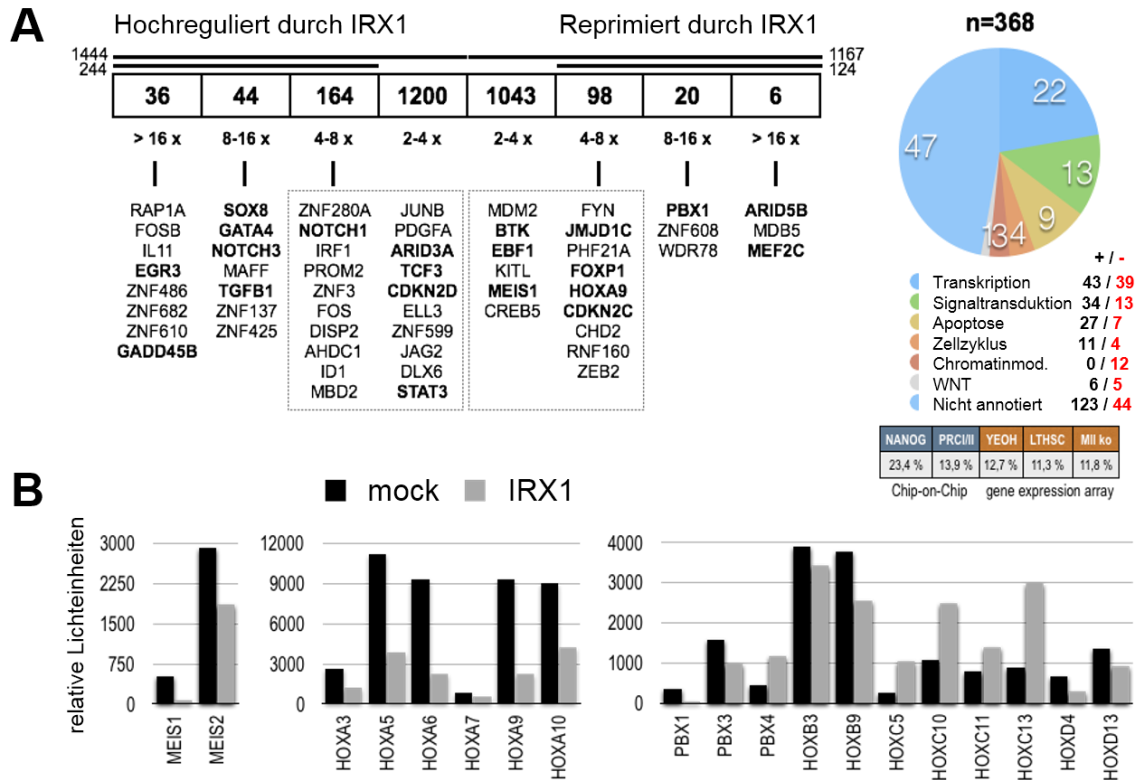


Abbildung 9: Auswertung des Genexpressionsprofils von transient überexprimiertem IRX1 in HEK293T-Zellen. DNA-Microarray-Analysen des Affymetrix HG-U133Plus 2.0 von transient transfizierten, *IRX1*-exprimierenden HEK293T-Zellen. Diese wiesen im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen eine Deregulierung von insgesamt 8.400 Genen auf (siehe GEO Acc. No. GSE75376). **(A)** Zusammenfassung der Gene, die die höchste Deregulierung aufwiesen. Hervorgehoben sind diejenigen Gene, die von besonderem Interesse und für spätere Analysen relevant sind. Die 369 Gene, die eine 4-fache oder höhere Deregulierung aufwiesen, wurden aufgrund ihrer Funktion zusammengefasst. Zweiundzwanzig Prozent dieser Gene stellen Transkriptionsfaktoren dar, gefolgt von Signaltransduktionsmediatoren und apoptoserelevanten Genen. Eine zusätzliche Übereinstimmung dieses GEP mit Chip-on-Chip oder weiteren GEP ergab eine Überlappung von bis zu 23,4 %, bzw. im Mittel 12 %. **(B)** Auswertung der relativen Lichteinheiten der DNA-Microarray-Daten in Bezug auf die *MEIS*-, *PBX*- und *HOX*-Cluster.

2.2 Reprimierung der *HOXA*-Gene durch die *IRX*-Transkriptionsfaktoren

Diese Doktorarbeit schloss thematisch an das Ende der Masterarbeit an. So wurde zunächst die Validierung der Daten des DNA-Microarrays in Bezug auf die *HOXA*-Genexpression vervollständigt. Hierzu wurde das *IRX1*- bzw. *IRX2*-Gen in die zweite Generation der *Sleeping Beauty*-Konstrukte über *Sfil* kloniert und als Kontrolle vollständig sequenziert. Die Expression der GOIs wurde *in vitro* über Fluoreszenzmikroskopie, RT-PCR und Western Blot-Versuche bestätigt.

Durch die Benutzung der pSBtet-IRX1-G-P-, pSBtet-IRX2cFLAG-G-P- und pSBtet-MLL-AF4-G-P-Konstrukte war es möglich, das GOI mit Hilfe der ebenfalls transfizierten Transposase pcGlobin SB100_{xco} über den *cut and paste*-Mechanismus (konservative Transposition) in geringen Kopienzahlen in das Genom der transfizierten Zelle zu integrieren. Dies führte zu einem gemäßigten Transkriptionslevel der Transgene in HEK293T-Zellen (siehe auch Kowarz *et al.*, 2015; Wächter *et al.*, 2014). Als Signal für die Transposition dienten die invertierten Sequenzbereiche (ITR: *inverted tandem repeat*), die den Insertionsbereich flankieren. Zudem wies der Tetracyclin-induzierbare TCE-Promotor der zweiten Generation der *Sleeping Beauty*-Konstrukte kaum bis keine Basaltranskription des GOI mehr auf. Positiv transfizierte Zellen wurden mit Hilfe des ebenfalls integrierten Resistenzmarkers (z.B. Puromycin-N-acetyl-transferase (P)) selektiert, bis eine homogene Zellpopulation genetisch manipulierter Zellen vorhanden war. Der Status der positiven Integration konnte über einen konstitutiv exprimierten Fluoreszenzmarker, wie z.B. *GFP*, sichergestellt werden.

Die folgende Abbildung fasst den schematischen Aufbau und die Funktion der einzelnen Vektorbestandteile der in dieser Arbeit verwendeten pSBtet-Vektoren der zweiten Generation zusammen und verdeutlicht des Weiteren den Verlauf einer stabilen Transfektion.

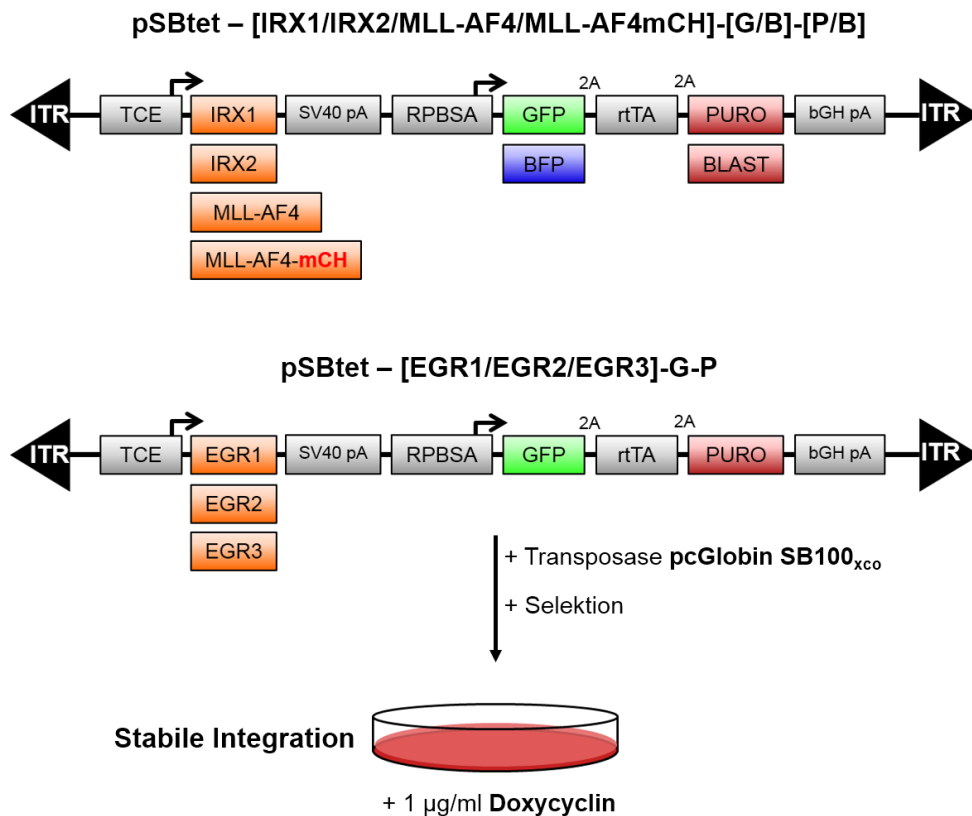


Abbildung 10: Schematische Darstellung der *Sleeping Beauty*-Konstrukte der zweiten Generation. Diese Expressionsplasmide besitzen zwei ORFs mit je einem konstitutiven (RPBSA) und einem Tetracyclin-induzierbaren (TCE) Promotor. Die Insertion des GOI erfolgt über spezifische *Sfi*I-Schnittstellen *in frame* hinter den Doxycyclin-induzierbaren Promotor. Dem GOI wird über den Vektor eine synthetische polyA-Sequenz (synPA/SV40pA) angefügt. Ein zweiter ORF dieses Plasmids unter dem RPBSA-Promotor beinhaltet das Gen eines Fluoreszenzproteins (*GFP*, *BFP*), des reversen Transaktivators rtTA^{2S}-M2 und eines Selektionsmarkers (Puromycin-N-acetyl-transferase (P), Blasticidin-S-Deaminase (B)). Alle Proteine des konstitutiven Leserahmens sind durch 2A-Peptide voneinander separiert und werden posttranslational proteolytisch voneinander getrennt. Diesem zweiten ORF ist ebenfalls eine synthetische polyA-Sequenz, ein *bovine growth hormone-polyA* (bGH-pA), angefügt. Als GOI wurden folgende cDNAs einkloniert: *IRX1*, *IRX2_cFLAG*, *EGR1_cFLAG*, *EGR2_cFLAG*, *EGR3_cFLAG*, *MLL-AF4*, *MLL-AF4mCH* und *luc2* (Luciferasegen als „Leervektor“). Alle Anhänge wurden direkt (*in frame*) an die Aminosäuresequenz des GOIs angefügt und das jeweilige Stopp-Codon an das 3'-Ende verlegt. Über die vorhandenen *inverted tandem repeats* (ITRs) und der Transposase pcGlobin SB100_{xco} kann eine konservative Transposition (*cut and paste*) in das Genom der transfizierten Zellen erfolgen (siehe auch 4.1.10).

Die Expression des GOIs der stabil transfizierten HEK293T-Zellen wurde für 48 h durch die Applikation von 1 µg/ml Doxycyclin induziert, die zytoplasmatische RNA isoliert, in cDNA transkribiert und über RT-PCR analysiert. Die Auswertung der relativen Expression der einzelnen *HOXA*-Gene erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Normiert wurden die Messungen auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem

Leervektor pSBtet-luc2-G-P transfizierte Zellen. Abbildung 11 zeigt neben der Überprüfung der Expression der inserierten Gene auch die Effekte der verschiedenen transfizierten HEK293T-Zellen auf die *HOXA*-Genexpression. Im Fokus standen hier die Gene *HOXA3-HOXA13*. Die hellgrauen Balken repräsentieren jeweils die Zellen mit einer ektopen *IRX1*- oder *IRX2*-Expression. In den schwarzen Balken ist die Expression des chimären *MLL-AF4* dargestellt und in den dunkelgrauen Balken ist jeweils eines der *IRX*-Gene mit dem *MLL-AF4* co-transfiziert. Die rote Linie stellt die auf 1,0 normalisierten Werte der mit dem Leervektor transfizierten Zellen dar (n=3, +S.E.M.).

Sowohl bei der Überexpression von *IRX1*, als auch bei *IRX2*, findet eine Reprimierung der untersuchten *HOXA*-Gene statt. Wie vermutet, bedingte eine *MLL-AF4*-Expression eine Steigerung der *HOXA*-Genexpression, wohingegen eine co-Transfektion von *IRX1* oder *IRX2* mit dem chimären *MLL-AF4* zu einer erneuten Reprimierung der untersuchten Gene führte. Die stärkste Reprimierung durch *IRX1* oder *IRX2* war bei *HOXA6* und *HOXA9* auszumachen. *HOXA7* wurde kaum bis gar nicht durch eines der integrierten Proteine dereguliert.

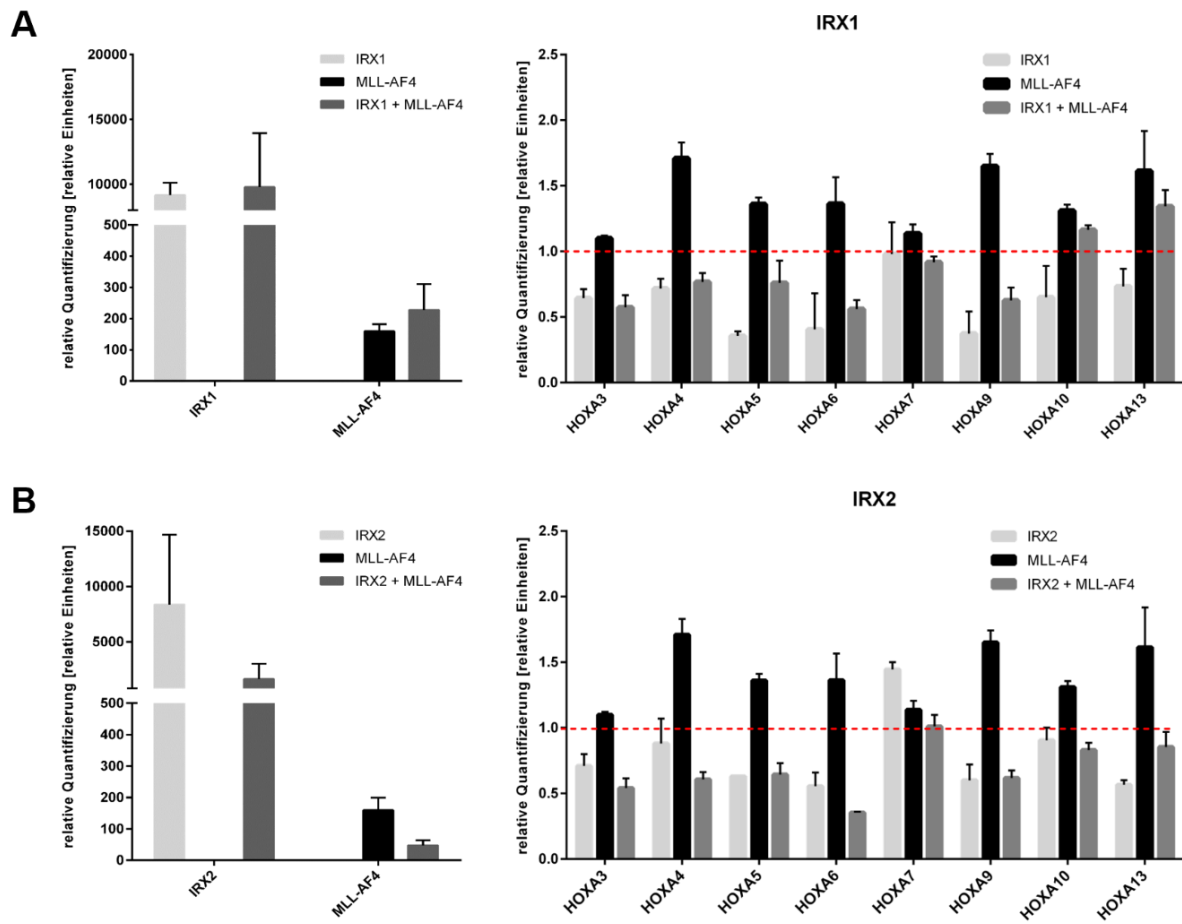


Abbildung 11: Inhibition der *HOXA*-Gene in Anwesenheit von IRX1 bzw. IRX2. Die Expression der stabil integrierten Gene **(A)** *IRX1* (hellgrau), **(B)** *IRX2* (hellgrau) und/oder *MLL-AF4* (schwarz, co-Transfektion: dunkelgrau) in HEK293T-Zellen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert und über RT-PCR-Analysen überprüft **(A+B, jeweils links)**. Des Weiteren erfolgte in den gleichen Zellen die Quantifizierung der Gene *HOXA3-HOXA13* **(A+B, jeweils rechts)**. Die Normierung der RT-PCR erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem pSBtet-luc2-G-P transfizierte Zellen, deren Expressionlevel auf 1,0 gesetzt wurde. Gezeigt ist die relative Quantifizierung der jeweiligen Gene nach der vergleichenden $\Delta\Delta Ct$ -Methode ($n=3$, $+S.E.M.$).

2.3 Beeinflussung der MLL-AF4-Komplexbildung durch IRX1

Bei der Auswertung der RT-PCR-Analysen der co-transfizierten HEK293T-Zellen zeigte sich, dass MLL-AF4 in der Ausübung seiner *HOXA*-expressionsfördernden Funktion behindert wird. Somit galt es zu prüfen, ob IRX1 direkt in den funktionell aktiven, multimeren MLL-AF4-Komplex rekrutiert wird oder ob durch eine Störung der Komplexbildung die durch das MLL-AF4 bedingte Modulation der Zielgenexpression beeinflusst wird. Hierzu wurden HEK293T-Zellen, denen zuvor entweder das IRX1 oder der Levektor stabil in ihr Genom integriert worden war, transient mit *mCherry*-markiertem MLL-AF4 transfiziert. Die erfolgreiche Expression der Konstrukte wurde über die

Expression der grünen Fluoreszenz des Vektors und der roten Fluoreszenz des *mCherry*-markierten MLL-AF4 mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops kontrolliert (siehe Abbildung 12A).

Da das MLL-AF4-Protein eine Masse von etwa 260 kDa aufweist, wurde für die Analyse der Komplexbildung über Co-Immunpräzipitationen (CoIP) eine Affinitätsaufreinigung über magnetische *Beads* herangezogen. Zudem war durch die 3'-terminale Markierung des *MLL-AF4*-Gens eine solide Grundlage geschaffen worden, dieses Protein gezielt aufzureinigen zu können. Mit einem N-terminalen MLL- oder C-terminalen AF4-Antikörper wäre sonst auch immer das wt-MLL bzw. wt-AF4 mit aufgereinigt worden. Nach der transienten Transfektion der stabil transfizierten IRX1- und mock-Zellen mit *MLL-AF4mCH* (pSBtet-MLL-AF4mCh-B-B) erfolgte die Transkriptionsinduktion der GOIs mit 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h. Nach der Extraktion der Gesamtzelllysate und der Normierung der Proteinkonzentrationen erfolgte die Immunpräzipitation mit Hilfe des *mCherry*- bzw., als Negativkontrolle, eines unspezifischen IgG-Antikörpers (siehe Abbildung 12, mCH-AK: Spur drei und vier, IgG-AK: Spur fünf und sechs). Als Positivkontrolle wurden jeweils in den ersten beiden Spuren unpräzipitierte Gesamtzelllysate aufgetragen und zudem die Anwesenheit des präzipitierten MLL-AF4mCH im ersten Blot sichergestellt (siehe Abbildung 12).

Die Untersuchung der Komplexität des MLL-AF4mCH-Multimers im Zusammenspiel mit IRX1 wurde unter mehreren Gesichtspunkten durchgeführt. Als Erstes wurde die Anwesenheit der Komplexpartner CYP33, BMI-1 und CDK9 untersucht. CYP33 vermittelt durch die Bindung an die PHD-Domäne die Rekrutierung der Komponente der Repressionsdomänen des MLL. Hierunter fallen die Proteine BMI-1, HPC2, CtBP und HDAC1 (Xia *et al.*, 2003). Hier galt es zu klären, ob CYP33 durch IRX1 an den Komplex herangeführt wird, da die trunkierte MLL-Variante durch das Fehlen der PHD-Domäne keine Bindung des CYP33 mehr ermöglicht, oder ob BMI-1 direkt durch IRX1 in den Komplex rekrutiert wird. CDK9 stellt eine Untereinheit des pTEFb dar, welches u.a. für die Phosphorylierung der CTD der RNAP II zuständig ist (Ramanathan *et al.*, 2001). Durch eine Inhibierung der produktiven Elongationsinitiierung durch IRX1 könnte auch hierüber eine verminderte *HOXA*-Expression eingeleitet werden. Abbildung 12 zeigt, dass in Anwesenheit von IRX1 keine Änderung der Komposition oder der Menge dieser Proteine zu detektieren war. Des Weiteren wurde überprüft, ob IRX1 die Bindung des MLL-AF4 an seine Zielgene verhindert. Dies wäre der Fall, wenn z.B. die Bindung des chimären Proteins an MENIN1 oder die p75-Isoform des LEDGF gestört würde, denn diese beiden Proteine sind direkt für die Rekrutierung des MLL an die DNA seiner Zielgene verantwortlich (siehe Kapitel 1.4). Die co-Immunpräzipitationsversuche belegen jedoch,

dass MENIN1 und LEDGF/p75 weiterhin im MLL-AF4mCH-Komplex vorhanden sind. Die Rekrutierung des DOT1L-Komplexes an MLL-AF4 ist *per se* nicht möglich, da der translozierte AF4-Terminus keine Bindedomäne des DOT1L mehr besitzt. Jedoch kann DOT1L über weitere Komplexe, wie dem EAP oder DotCom an MLL-AF4 herangeführt werden und über seine H3K79me direkt die Transkription der Zielgene beeinflussen (siehe Kapitel 1.4.1). Im Fall der MLL-AF4mCH-transfizierten HEK293T-Zellen ändert sich allerdings die Menge des co-präzipitierten DOT1L durch die Anwesenheit von IRX1 nicht.

Die Co-Immunpräzipitationsversuche bestätigten, dass IRX1 direkt mit dem MLL-AF4mCH-Komplex interagiert. Das Vorhandensein des IRX1 hat jedoch keinen Einfluss auf die Komplexbildung des MLL-AF4 mit seinen Interaktionspartnern.

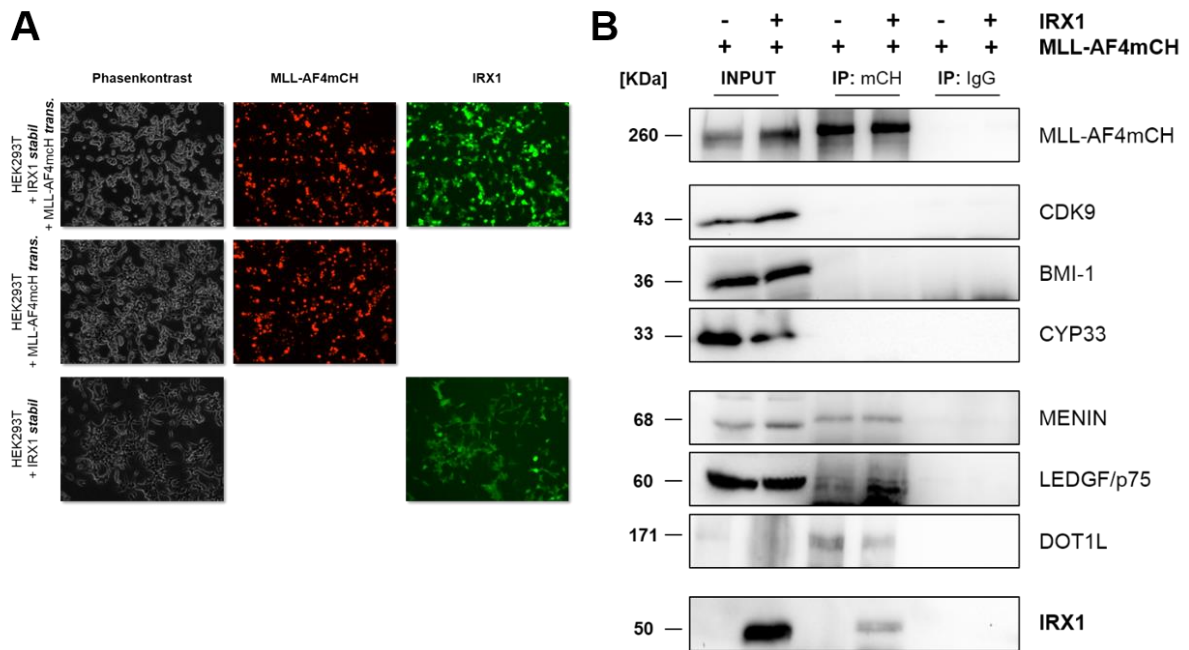


Abbildung 12: Co-Immunpräzitationsversuche des MLL-AF4mCH. HEK293T, die zuvor mit *IRX1* oder *luc2* (Leervektor) stabil transfiziert worden waren, wurden transient mit *MLL-AF4mCH* transfiziert. **(A)** Kontrolle der transfizierten HEK293T-Zellen durch Fluoreszenzmikroskopieanalysen. Die erste Spalte zeigt die Zellen im Phasenkontrast, die zweite Spalte zeigt die rote Fluoreszenz des *mCherry*-markierten MLL-AF4 (pSBtet-MLL-AF4mCH-B-B). In der dritten Spalte ist die grüne Fluoreszenz des integrierten *IRX1*-Konstrukts (pSBtet-IRX1-G-P) dargestellt. Die erste Zeile bestätigt die co-Transfektion der HEK293T-Zellen durch die Fluoreszenz beider Marker. Die zweite und dritte Zeile weisen jeweils die Fluoreszenz eines der beiden Marker auf. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzmarker betrug 500 ms, die des Phasenkontrasts 1 ms. **(B)** Western Blot-Analysen der MLL-AF4mCH- und MLL-AF4mCH/*IRX1*-exprimierenden Zellen zur Analyse der Proteinkomposition des MLL-AF4mCH-Komplexes. Die ersten beiden Spuren zeigen die INPUT/Lysat Kontrolle (Positivkontrolle), die dritte und vierte Spur repräsentieren die über magnetische *Beads* affinitätsaufgereinigten Proteine. Als Negativkontrolle erfolgte die Aufreinigung mit einem unspezifischen IgG-Antikörper (Spuren fünf und sechs). Als Kontrolle ist im ersten Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung des MLL-AF4mCH-Proteins gezeigt. Die Co-Immunpräzitationen zeigen, dass *IRX1* die Komposition des MLL-AF4mCH-Komplexes nicht ändert, jedoch selbst im Komplex vorhanden ist.

2.4 Chromatin-Immunpräzitationsanalyse zur Klärung der funktionellen Interaktion der *IRX1*/*MLL-AF4*-Verbindung

Die vorangegangenen Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktionen belegten, dass *IRX1* die Komposition des MLL-AF4mCH-Komplexes zwar nicht ändert, jedoch durch die Präzitation des Komplexes mit aufgereinigt werden konnte. Dies ließ die Vermutung zu, dass *IRX1* eine funktionelle Störung des Fusionsproteins bewirken könnte, was zu einer Reprimierung der *HOX*-Gene in den *HOXA*^{low}-Patienten bzw. den hier co-transfizierten Zellen führt. Zur Überprüfung dieser These wurden Chromatin-Immunpräzitations-

analysen (ChIP) herangezogen. Durch sie ist es möglich nachzuweisen, welche Proteine bzw. welche Transkriptionsfaktoren an bestimmte Chromatinbereiche binden. Genauer gesagt wurden hierbei die Promotorbereiche der bekannten MLL-AF4-Zielgene, *HOXA9* und *HOXA10*, untersucht. Die Präzipitationsversuche wurden mit einem unspezifischen IgG-Antikörper als Negativkontrolle und den spezifischen *mCherry*-, MLL-C- und IRX1-Antikörpern durchgeführt. Der *mCherry*-Antikörper diente der Präzipitation des MLL-AF4mCH-Komplexes. Der MLL-C-Antikörper diente der spezifischen Detektion des Wildtyp-MLL, da das trunkierte MLL-AF4-Protein die C-terminale Erkennungsregion dieses Antikörpers (AS 2829-2883) nicht mehr besitzt. Die ChIP-Versuche wurden mit verschiedenen transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden die mit dem Leervektor (pSBtet-luc2-G-P) transfizierten Zellen verwendet. Zudem wurden mit den pSBtet-IRX1-G-P- oder pSBtet-IRX1-G-P- und pSBtet-MLL-AF4mCH-B-B-Konstrukten transfizierte Zellen herangezogen. Hierbei wurden alle Konstrukte stabil in das Genom der Zellen integriert. Bei Doppeltransfektionen wurde jeweils ein Konstrukt stabil integriert, während das andere transient transfiziert wurde. Beide sich hieraus ergebenden Kombinationsmöglichkeiten von *IRX1* mit *MLL-AF4mCH* wurden analysiert. Die Expression der pSBtet-Konstrukte wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Alle Versuche wurden drei- bis fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei in Abbildung 13 eine repräsentative Auswertung dargestellt ist. Die Auswertung erfolgte nach der „Percent Input Method“ von life Technologies (Thermo Fisher Scientific) und wurde in Triplikaten gemessen (+S.E.M.).

In Abbildung 13A sind sowohl der *HOXA9*- als auch *HOXA10*-Promotor dargestellt. Die Oligonukleotide zur Amplifizierung dieser Chromatinbereiche lagen jeweils innerhalb des ersten Exons (siehe Tabelle 7). Die Präzipitation des fixierten Chromatins mit dem unspezifischen IgG-Antikörper ergab keine Detektion gebundener DNA, was die korrekte Durchführung des Versuchs bestätigt (Abbildung 13, weiße Balken). Zudem konnte durch die Präzipitation des MLL-AF4mCH-Proteins eine große Menge *HOXA9*- und *HOXA10*-Chromatin aufgereinigt werden (Abbildung 13, schwarze Balken). Bei der Präzipitation des IRX1-Transkriptionsfaktors zeigt sich eine gesteigerte Menge des gebundenen *HOXA*-Chromatins in der Anwesenheit des MLL-AF4mCH-Proteins (Abbildung 13A, hellgraue Balken), was sich mit den Ergebnissen der CoIP-Versuche deckt (siehe Abbildung 12). Die Anwesenheit des IRX1 änderte jedoch nicht die funktionelle Eigenschaft des MLL-AF4mCH an sein Zielgenchromatin binden zu können (Abbildung 13A, schwarze Balken, MLL-AF4 + IRX1).

Des Weiteren wurde die Bindefähigkeit des Wildtyp-MLL an die Promotorbereiche der beiden *HOXA*-Gene untersucht. Diese Versuchserweiterung kam durch Arbeiten von

Ahmad *et al.* zustande, der zeigen konnte, dass MLL-AF4 in der Anwesenheit eines HDAC-Inhibitors, wie z.B. Trichostatin A (TSA) oder Apicidin, vom Promotor seines Zielgens (hier: Arachidonat-5-Lipoxygenase) dissoziiert und stattdessen das endogene MLL rekrutiert (Ahmad *et al.*, 2014). Zunächst zeigte eine Präzipitation des wt-MLL in der Anwesenheit des IRX1 die höchste Bindefähigkeit (Abbildung 13A, dunkelgrauer Balken, besser sichtbar bei *HOXA9*). Um den Effekt des HDAC-Inhibitors auf die Bindung des MLL-AF4mCH an das Chromatin der *HOXA9*- und *HOXA10*-Promotoren zu untersuchen, wurden dieselben Versuche aus Abbildung 13A wiederholt und hierbei 16 h vor der Fixierung mit 300 nM TSA behandelt. Als Kontrolle wurden die Versuche aus Abbildung 13A mit der gleichen Menge an DMSO durchgeführt.

Die Kontrolle der CoIP-Versuche in Abbildung 13B mit dem unspezifischen IgG-Antikörper bestätigte wie zuvor eine korrekte und spezifische Präzipitation des Chromatins während der Behandlung mit TSA, da keine Signale des *HOXA9*- und *HOXA10*-Promotorchromatins messbar waren (siehe Abbildung 13B, weiße Balken). Die Behandlung mit TSA führte jedoch im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Versuchen aus Abbildung 13A zu einem Verschwinden des IRX1 von beiden Promotorbereichen (vgl. hellgraue Balken in Abbildung 13A+B). Wie bereits zuvor durch Ahmad *et al.* beschrieben, dissoziiert MLL-AF4mCH vom Promotor der beiden Zielgene (siehe Abbildung 13B, schwarze Balken, MLL-AF4) und führt zu einer Rekrutierung des endogenen MLL (siehe Abbildung 13B, dunkelgrauer Balken, MLL-AF4, besser sichtbar bei *HOXA10*). Durch die Anwesenheit des IRX1 bei den co-transfizierten Zellen mit MLL-AF4mCH ergab sich ein differenziertes Bild. Obwohl IRX1 nicht mehr an den Promotoren detektierbar war (siehe Abbildung 13B, hellgraue Balken), bewirkte eine co-Transfektion beider Faktoren in Anwesenheit von TSA ein Ausbleiben der MLL-AF4mCH-Dissoziation und somit eine Stabilisierung dieses Komplexes an den Promotoren (siehe Abbildung 13B, schwarze Balken, MLL-AF4+IRX1). Durch das Besetzen der Promotorregion konnte des Weiteren auch kein endogenes MLL rekrutiert werden (siehe Abbildung 13B, dunkelgraue Balken, MLL-AF4 + IRX1).

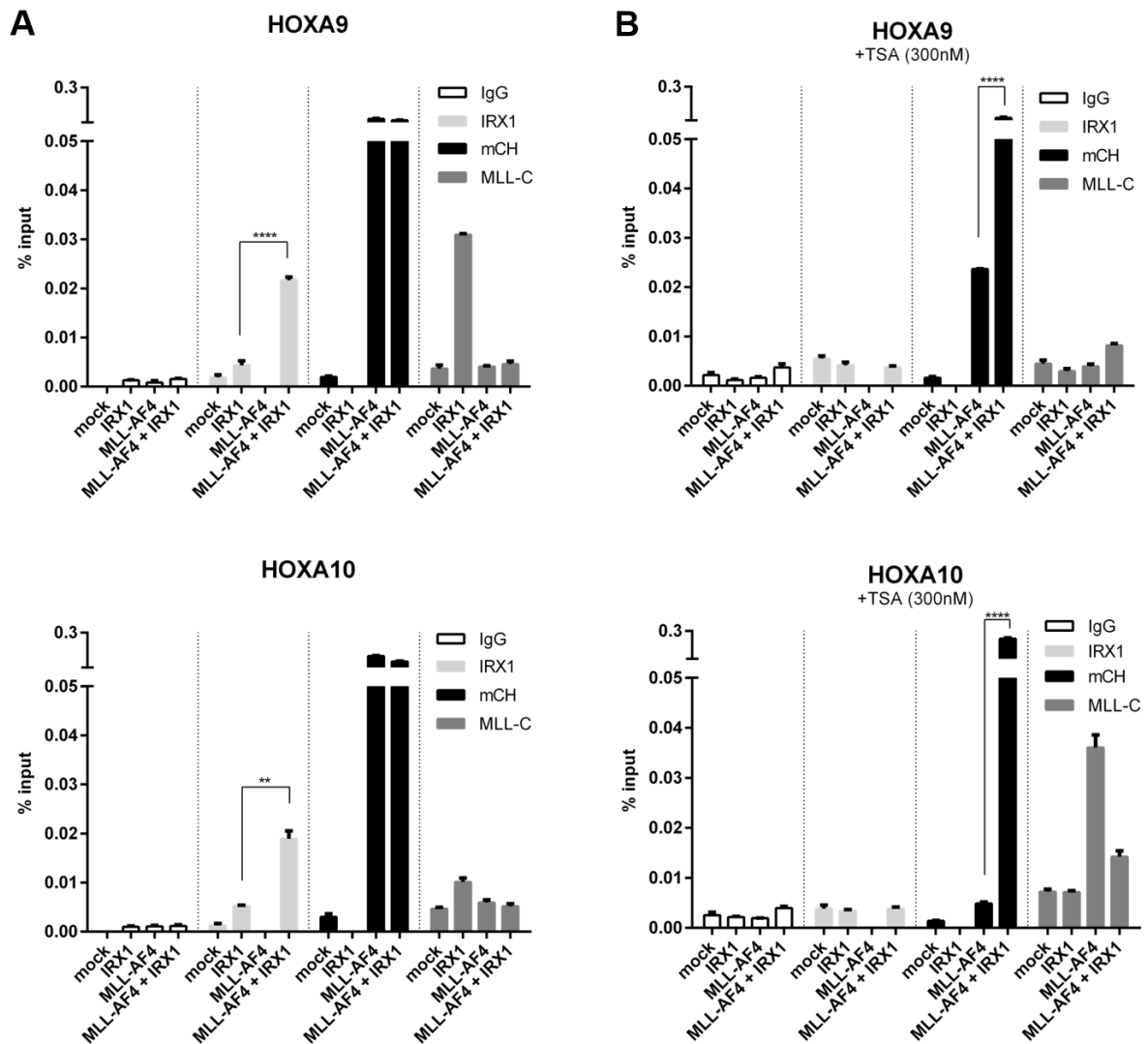


Abbildung 13: Chromatin-Immunpräzipitationsversuche zur Aufklärung der funktionellen Eigenschaften der IRX1/MLL-AF4mCH-Interaktion. Die Expression von mit dem Leervektor transfizierten und IRX1-, MLL-AF4mCH- oder co-transfizierten HEK293T-Zellen wurden für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. 16 h vor der Fixierung wurden die Ansätze jeweils mit 300 nM TSA **(A)**, bzw. der gleichen Menge DMSO **(B)** versetzt. Die Präzipitation der mit dem Chromatin fixierten Proteine, bzw. Transkriptionsfaktoren, wurde mit IgG-, IRX1-, *mCherry*- (mCH) und MLL-C-Antikörpern durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei bis fünf unabhängig durchgeführten Versuchen, gemessen in Triplikaten (+S.E.M.) und ausgewertet nach der „Percent Input Method“ von life Technologies (Thermo Fisher Scientific). Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Untersucht wurden die Promotorregionen (in Exon 1) der *HOXA9*- und *HOXA10*-Gene. **(A)** Die Bindung des IRX1 wird durch MLL-AF4mCH gefördert. MLL-AF4mCH bindet unabhängig von der Anwesenheit des IRX1 stark an beide Promotoren. Das Wildtyp-MLL wird durch die Anwesenheit von IRX1 an die Promotoren rekrutiert. **(B)** TSA bewirkt die Dissoziation des MLL-AF4mCH von den Promotoren, jedoch nur, wenn IRX1 nicht in den Zellen vorhanden ist. Zudem wird anstatt des MLL-AF4mCH das endogene MLL an die Promotoren rekrutiert (siehe *HOXA10*). IRX1 ist nicht mehr detektierbar.

2.5 Investigation des Effekts des pan-HDAC-Inhibitors Trichostatin A auf die funktionellen und die komplexbildenden Eigenschaften des IRX1/MLL-AF4-Komplexes

Wie bereits beschrieben wurde, führten die Arbeiten von Ahmad *et al.* zu der Erkenntnis, dass das Fusionsprotein MLL-AF4 durch die Zugabe des HDAC-Inhibitors Apicidin vom Promotor seiner Zielgene dissoziiert und stattdessen das endogene MLL rekrutiert. Durch die Blockierung der Histondeacetylasen verbleiben die Acetylierungen an den Histonen und die transkriptionelle Expression kann weiterhin reguliert werden. Zudem wird durch die Acetylierung von Histonen im Promotorbereich die Bindung von Transkriptionsfaktoren verbessert. Die Daten in Abbildung 13B validieren die Ergebnisse von Ahmad *et al.* und erweitert sie um weitere Zielgene des MLL-AF4. Durch die Behandlung der Zellen mit TSA zeigte sich ein weiterer Effekt. Die Dissoziation des MLL-AF4mCH von seinen Zielgenpromotoren wird durch die Anwesenheit des IRX1 gestört (siehe Abbildung 13B, schwarze Balken). Dies hat zur Folge, dass MLL-AF4mCH am Promotor verbleibt und kein endogenes MLL rekrutiert werden kann. Zudem zeigte sich, dass IRX1 durch die TSA-Behandlung nicht mehr am Promotor detektierbar war, weder einzeln, noch im Komplex mit MLL-AF4mCH (Abbildung 13B, hellgrauer Balken). IRX1 scheint somit den Einfluss des pan-HDAC-Inhibitors auf das Fusionsprotein indirekt zu stören. Unter dem Gesichtspunkt wurden sowohl die CoIP-Experimente aus 2.3 als auch die RT-PCR-Versuche aus 2.2 um weitere Experimente in Anwesenheit des HDACi TSA erweitert.

Durch die CoIP-Experimente sollte geklärt werden, ob die Behandlung mit TSA die Komplexität des MLL-AF4mCH ändert. Der Versuch wurde wie in 2.3 beschrieben durchgeführt. Die Inkubation mit 300 nM Inhibitor wurde auf 24 h ausgeweitet. Die Zellen der CoIP-Experimente in Abbildung 12 waren bereits als Kontrolle mit der gleichen Menge DMSO über den gleichen Zeitraum versetzt worden. Neben den bereits in 2.3 in Western Blot-Versuchen untersuchten Proteinen des MLL-AF4mCH-Komplexes wurden die Versuche hier um das Protein HDAC1 erweitert.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, beeinflusst die Behandlung der Zellen mit 300 nM TSA für 24 h die Zusammensetzung der klassischen, bereits untersuchten, Interaktionspartner nicht. Jedoch ist durch die Behandlung mit TSA der IRX1-Transkriptionsfaktor nicht mehr im Komplex vorhanden. Dies deckt sich mit den ChIP-Daten, wo auch hier, unabhängig von MLL-AF4mCH, durch eine TSA-Behandlung kein IRX1 am Chromatin der *HOXA9*- bzw. der *HOXA10*-Promotoren zu detektieren war (siehe Abbildung 13A+B, hellgraue Balken). Es zeigt sich zudem, dass die Histondeacetylase HDAC1, welche zuvor im Komplex vorhanden war, durch TSA dissoziiert (siehe Abbildung 14, letzter Blot).

Daran angeschlossen wurden CoIP-Experimente, die klären sollten, ob IRX1 über die gebundenen Interaktionspartner, wie z.B. HDAC1 (die ebenfalls in der Anwesenheit von TSA verschwindet), MENIN1 oder LEDGF in den MLL-AF4mCH-Komplex rekrutiert wird. Jedoch belegten diese Versuche keine direkte Protein-Protein-Interaktion der genannten Faktoren mit dem Transkriptionsfaktor IRX1 (Daten nicht gezeigt).

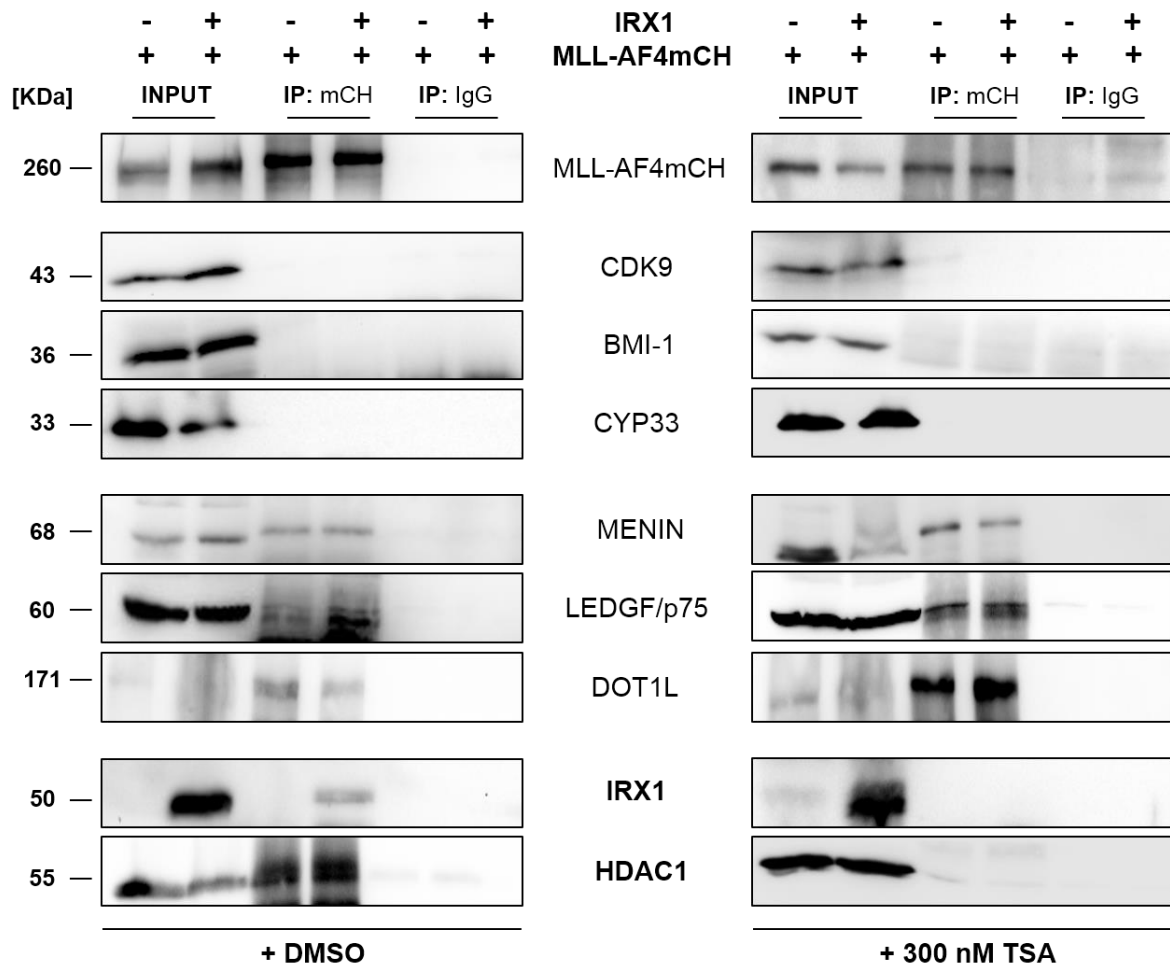


Abbildung 14: Beeinflussung der MLL-AF4mCH-Komplexkomposition durch die Behandlung mit Trichostatin A. Western Blot-Analysen der MLL-AF4mCH- und MLL-AF4mCH/IRX1-exprimierenden Zellen zur Analyse der Proteinkomposition des MLL-AF4mCH-Komplexes. Die jeweils ersten beiden Spuren zeigen die INPUT/Lysat-Kontrolle (Positivkontrolle), die dritte und vierte Spur repräsentieren die über magnetische *Beads* affinitätsaufgereinigten Proteine. Als Negativkontrolle erfolgte die Aufreinigung mit einem unspezifischen IgG-Antikörper (Spuren fünf und sechs). Als Kontrolle ist im ersten Western Blot jeweils die erfolgreiche Aufreinigung des MLL-AF4mCH-Proteins gezeigt. Die CoIP-Experimente aus Abbildung 12 wurden um die Proteininteraktion des HDAC1 mit dem MLL-AF4mCH-Komplex erweitert. **(A)** Siehe Abbildung 12. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von DMSO (Menge angepasst an das Volumen der zugegebenen TSA-Lösung) für 24 h **(B)** Durch die Behandlung mit 300 nM TSA für 24 h dissoziieren IRX1 und HDAC1 aus dem MLL-AF4mCH-Komplex.

Neben den CoIP- und ChIP-Daten galt es ebenfalls zu überprüfen, wie sich eine TSA-Applikation auf die *HOXA*-Transkription auswirkt. So wurden im Vergleich zu den in Abbildung 11 gezeigten Effekten des IRX1 und/oder des MLL-AF4 dieselben RT-PCR-Experimente durchgeführt, bei denen die stabil transfizierten Zellen jedoch nach der Induktion der GOI-Expression durch 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h zusätzlich einer Behandlung mit 300 nM TSA für 24 h unterzogen wurden. Nach der Isolierung der zytoplasmatischen RNA und der Reversen Transkription in cDNA wurden RT-PCR-Versuche durchgeführt. Die Normierung der Daten erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Die Auswertung der relativen Expression der einzelnen *HOXA*-Gene erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Gezeigt ist die relative Quantifizierung der Gene *HOXA3-HOXA13* (n=3, +S.E.M.).

Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen waren die *IRX1*-exprimierenden Zellen nach der Applikation von TSA nicht mehr in der Lage, die *HOXA*-Transkription zu reprimieren (Abbildung 15 A+B; hellgraue Balken). Ebenso wiesen die *MLL-AF4*-exprimierenden Zellen und auch die co-transfizierten Zellen keine signifikante Überexpression der untersuchten *HOXA*-Gene mehr auf. Abbildung 15E bestätigt, dass die Applikation von Trichostatin A das Level der zur Normierung der RT-PCR-Daten herangezogenen *GAPDH*-Expression, als auch die Level der eingebachten *IRX1* und/oder der *MLL-AF4*-Expression nicht beeinflusst.

Somit lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass IRX1 indirekt die *HOXA*-Transkription reprimieren kann und zudem dominant negativ über den aktivierenden Effekt des MLL-AF4 auf die *HOX*-Gene wirkt. HDAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A, bewirken eine Dissoziation des IRX1 und MLL-AF4mCH vom Promotor der *HOXA*-Gene und führen zeitgleich zu einer Rekrutierung des wt-MLL an diese Promotoren, was zu einer Normalisierung der *HOXA*-Transkription führt. Zudem verhindert IRX1 nach der Behandlung mit TSA eine Dissoziation des MLL-AF4mCH vom *HOXA*-Promotor, ohne jedoch selbst im Komplex oder am Promotor vorhanden zu sein. IRX1 beeinflusst die Zusammensetzung des MLL-AF4mCH-Komplexes in Bezug auf die untersuchten Interaktionspartner nicht, ist jedoch selbst im Komplex vorhanden und dissoziiert ebenso wie HDAC1 aus diesem Komplex, sobald ein pan-HDAC-Inhibitor appliziert wird (siehe auch Abbildung 15D).

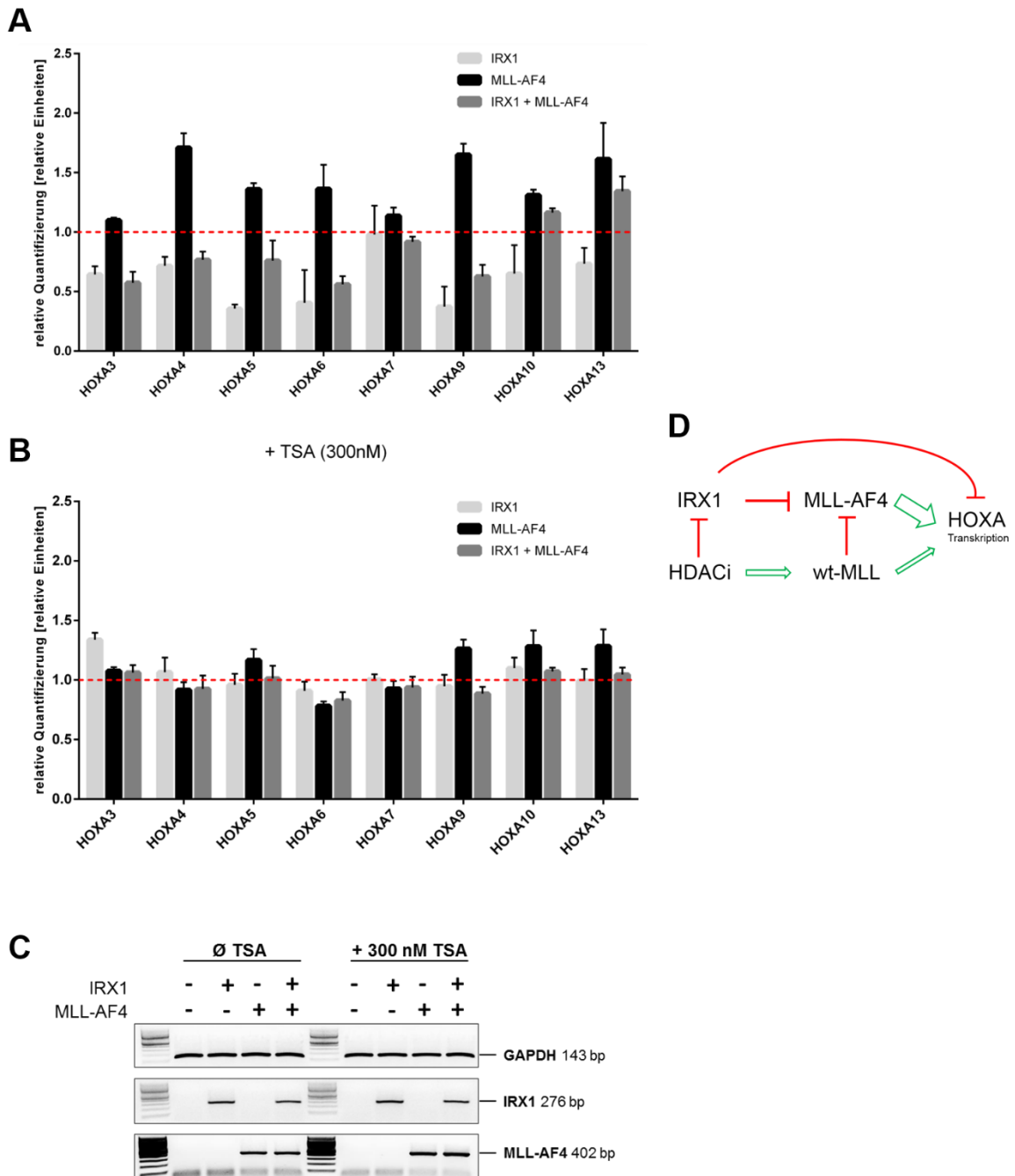


Abbildung 15: Effekt der Trichostatin A-Behandlung auf die Genexpression der HOXA-Gene.

Die stabil transfizierten HEK293T-Zellen, die *IRX1* und/oder *MLL-AF4* exprimieren, wurden bezüglich ihrer *HOXA*-Genexpression nach der Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin untersucht. **(A+B)** RT-PCR-Analysen der verschiedenen transfizierten Zelllinien **(A)** ohne und **(B)** mit einer Behandlung von 300 nM TSA für 24 h. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Gezeigt ist die relative Quantifizierung der Gene *HOXA3-HOXA13* (n=3, +S.E.M.). **(C)** Validierung der Applikation von 300 nM TSA für 24 h. Die Transkription der zur Normierung der RT-PCR herangezogenen *GAPDH*-Expression und auch die *IRX1*- und *MLL-AF4*-Expression wurden durch die Behandlung nicht beeinflusst. **(D)** Schaubild zu Verdeutlichung der inhibierenden und aktivierenden Eigenschaften von *IRX1* im Zusammenhang mit *MLL-AF4*, HDACi und dem Wildtyp-*MLL* (wt-*MLL*).

2.6 Etablierung der nicht-viralen, stabilen Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation

Bisher war eine Validierung der Ergebnisse in leukämischen Suspensionszelllinien, die durch genetischen Manipulationen generiert wurden, nur unter der Zuhilfenahme viraler Transfektionsmethoden möglich. Diese sind jedoch mit einigen Nachteilen behaftet. Neben der Größenlimitierung der zu transfizierenden Plasmide, der Wahrscheinlichkeit der Insertion des GOI in aktive Genbereiche, der Erforderlichkeit spezieller S2-Labore, aber auch der geringen Effizienz und der hohen Sterblichkeit der Zellen nach der Transfektion, waren Suspensionszellen bisher keine geeigneten Zelllinien für stabile Transfektionen durch Retrovirale Systeme. Die *Sleeping Beauty*-Vektoren präferieren keine bestimmte Region im Genom und integrieren am häufigsten in Bereich einer „sicheren Umgebung“ (*safe harbor*). Das heißt, sie sind in nichtkonservierten Bereichen außerhalb aktiver Gene zu finden. Zudem integrieren sie häufig 50 kb vor TSS und 300 kb von miRNA und Onkogenen entfernt. Die Wahrscheinlichkeit einer Zerstörung regulatorisch relevanter Bereiche einer Zelle durch die konservative Transposition ist im Gegensatz zu bisherigen Insertionsmethoden, wie z.B. den Retroviren, sehr gering (Gogol-Döring *et al.*, 2016).

Durch die Verwendung des *Nucleofectors*[™] 2b gab es die Möglichkeit, durch abgestimmte Puffersysteme und Elektroporationsprotokolle Suspensionszellen zu transfizieren. Zwar war auch hierbei die Effizienz der Transfektionen teilweise gering, jedoch ermöglichte die Benutzung unserer *Sleeping Beauty*-Konstrukte, selbst geringe Mengen an positiv transfizierten Zellen durch Selektion zu einer Population stabil transfizierter Zellen hochzuziehen. Im Portfolio des *Nucleofector*-Systems gab es kein Protokoll für t(4;11)-positive Zellen, wie den RS4;11 oder SEM. So leitete ich über die Zellgröße und die Eigenschaften bereits beschriebener Zellen und durch Testungen verschiedener Elektroporationsprogramme und Puffersysteme eine geeignete Bedingung ab, die es ermöglichte, zumindest SEM-Zellen zu transfizieren. Als besonders geeignet hat sich hierbei das Programm T-016 mit dem *AMAXA*[®] *Cell line Nucleofector*[®] *Kit R* erwiesen. Die Zellen wurden wie im Protokoll des *Nucleofectors*[™] 2b erwähnt transfiziert. Jedoch wurde ein Zwanzigstel der DNA-Menge durch die Transposase pcGlobin SB100_{xco} ersetzt, was eine Insertion des pSBtet-IRX1-G-P-Konstrukts in das Genom der SEM-Zellen ermöglichte. SEM-Zellen (ACC-546, DSMZ) sind B-Zell-Vorläuferzellen, die eine MLL-AF4-Translokation aufweisen. Die transgenen SEM-Zellen wurden über mehrere Wochen mit 1-2 µg/ml Puromycin selektioniert, sodass eine homogen transfizierte Zellpopulation zur Verfügung stand. Als Kontrolle wurden SEM-Zellen mit dem Leervektor pSBtet-luc2-R-P oder pSBtet-luc2-G-P transfiziert. Die ektopische Expression des *IRX1* wurde

über Fluoreszenzmikroskopie, RT-PCR- und Western Blot-Analysen überprüft. Des Weiteren erfolgte die Validierung der in HEK293T-Zellen durchgeführten RT-PCR-Experimente in Bezug auf die co-Transfektionen von *IRX1* und *MLL-AF4*. Hierzu wurde die Expression der pSBtet-Konstrukte der transgenen SEM-Zellen für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Für die Western Blot-Versuche wurde das Gesamtzelllysate extrahiert, die Proteinkonzentrationen aufeinander normiert und die korrekte Translation des *IRX1* über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Hierbei wurde zusätzlich Aktin als Ladekontrolle detektiert (siehe Abbildung 16C). Für die PCR- und RT-PCR-Versuche wurde zytoplasmatische RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die Normierung der RT-PCR-Versuche erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem Leervektor transfizierte bzw. untransfizierte SEM-Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Die Auswertung der relativen Quantifizierung der *HOXA*-Gene erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode (n=3-6, +S.E.M., siehe Abbildung 16B+D). Die RT-PCR-Daten bestätigen die zuvor in HEK293T generierten Daten in Bezug auf die reprimierende Eigenschaft des *IRX1* auf die *HOXA*-Gene. Wie bereits in Abbildung 11A bei den co-transfizierten HEK293T-Zellen zu sehen ist, sind auch hier die Gene *HOXA7*, *10* und *13* (dunkelgrauer Balken) am wenigsten durch *IRX1* reprimiert (vgl. Abbildung 11B mit Abbildung 16D).

Durch die Etablierung einer nicht-viralen Transfektionsmethode mit Hilfe des *Nucleofectors™ 2b* (Lonza) war es erstmals möglich, die Suspensionszelllinie SEM zu transfizieren, ohne S2-basierte Arbeiten durchführen zu müssen. Durch die Generierung einer transgenen Zelllinie, die physiologisch die Translokationsprodukte *MLL-AF4* und *AF4-MLL* trägt, konnten zudem die Daten der transgenen HEK293T-Zellen in einem geeigneten, leukämischen Zellsystem validiert werden.

Die Transfektion der t(4;11)-Zelllinie RS4;11 war leider nicht erfolgreich, da die Sterblichkeit selbst nach der Testung mehrerer Elektroporationsprotokolle und Puffersysteme zu hoch war und die Zellen zudem nach wenigen Stunden eine *GFP*-ähnliche Eigenfluoreszenz aufwiesen, was eine Selektion unmöglich machte.

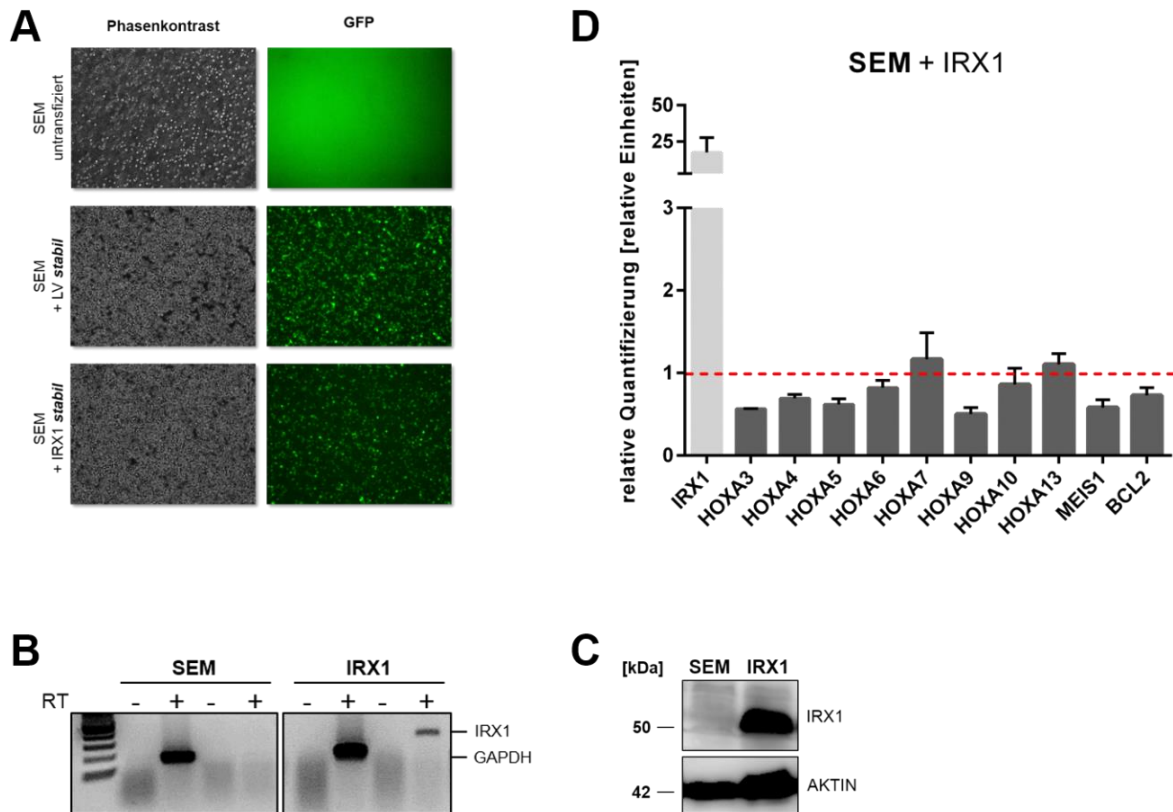


Abbildung 16: Validierung der reprimierenden Eigenschaften des IRX1 in der t(4;11)-Zelllinie SEM. Die Transfektion der Suspensionszelllinie SEM erfolgte mit Hilfe des *Nucleofector*TM 2b von Lonza, dem Programm T-016 und dem *AMAXA*[®] *Cell line Nucleofector*[®] Kit R (Lonza). Die Expression der pSBtet-Konstrukte wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der GFP-Fluoreszenz der mit *IRX1*, dem Leervektor (LV) und untransfizierten SEM-Zellen. **(B)** Kontrolle der cDNA der *IRX1*-transfizierten Zellen. Als Kontrolle dienten hier mit dem Leervektor transfizierte Zellen und das Haushaltsgen *GAPDH*. Aufgetragen ist sowohl die aufgereinigte RNA (-Reverse Transkription (RT)), als auch die umgeschriebene cDNA (+RT). **(C)** Die korrekte Translation des *IRX1*-Proteins wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und im Vergleich zu untransfizierten SEM-Zellen in einem Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert. **(D)** Relative Quantifizierung der *HOXA*-Transkription sowie *BCL2*- und *MEIS1*-Transkription durch RT-PCR-Analysen. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3-6, +S.E.M.).

2.7 Verstärkung des reprimierenden Effekts des IRX1 durch simultane EGR-Expression

Durch das während der Bachelorarbeit angefertigte Genexpressionsprofil (GEO Acc. No. GSE75376) *IRX1*-transfizierter HEK293T-Zellen zeigte sich eine Deregulierung von insgesamt 8.400 Genen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen (siehe Abbildung 9A). Hierbei war *EGR3* (*Early Growth Response 3*) eines der am stärksten hoch-

regulierten Gene (28-fach; p-Wert: 0,00002). EGR-Proteine (EGR1-4) gehören den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren an und besitzen eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne mit drei Zinkfingermotiven, welche direkt an den Promotorbereich ihrer Zielgene binden. Die EGR1-3-Proteine besitzen zusätzlich eine Repressionsdomäne, welche das NAB-Protein bindet und dadurch die Transkription der Zielgene reprimiert (O'Donovan *et al.*, 1999; Svaren *et al.*, 1998). Zunächst wurde die relative Expression der *EGR1-3*-Gene in den mit *IRX1* transfizierten Zelllinien HEK293T und SEM überprüft. Hierzu wurde die Expression der GOIs der transgenen Zelllinien für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Nach der Isolierung der zytoplasmatischen RNA und der Reversen Transkription in cDNA schlossen RT-PCR-Versuche mit spezifischen *EGR1-3* Oligonukleotiden an. Die Normierung der RT-PCR-Versuche erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten mit dem Leervektor transfizierte HEK293T- bzw. SEM-Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3, +S.E.M.). Wie in Abbildung 17A zu sehen ist, werden in beiden Zelllinien die *EGR1-3*-Gene vermehrt transkribiert. Eine Ausnahme stellt *EGR1* in der t(4;11)-Zelllinie SEM dar. Diese Reprimierung geht jedoch einher mit einer Überexpression von CDK6, welches direkt die Expression des *EGR1* reprimiert (Placke *et al.*, 2014; Scheicher *et al.*, 2015) (siehe 3.4). Nachdem die Daten des GEP in Bezug auf die *EGR1-3*-Expression in beiden Zelllinien validiert wurden, folgten RT-PCR-Experimente, die den Effekt der EGR-Proteine auf die *HOXA*-Genexpression überprüfen sollten. Hierzu wurde die cDNA der *EGR1-3* Gene in pSBtet-G-P-Vektoren über *SfiI* kloniert und am 3'-Ende, *in frame*, mit einem FLAG-Anhang versehen. Das Stopp-Codon wurde entfernt und hinter den FLAG-Anhang gesetzt. Nach der vollständigen Sequenzierung der konstruierten Vektoren wurden HEK293T-Zellen jeweils stabil mit einem der *EGR*-Plasmide transfiziert und die Expression für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Die aberrante Transkription bzw. die aberrante Translation der Transgene wurde über PCR und Western Blot sichergestellt. Hierzu wurde den stabil transfizierten Zellen entweder die zytoplasmatische RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde, oder das Gesamtzelllysat extrahiert. Eine RT-PCR-Analyse im Vergleich zu Leervektor transfizierten HEK293T-Zellen, deren Expressionslevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie), diente der Untersuchung der Transkriptionslevel der *EGR*- sowie der *HOXA*-Gene. Die Normierung der RT-PCR-Versuche erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Die Auswertung der relativen Quantifizierung der *HOXA*-Gene erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3, +S.E.M.). In Abbildung 17B zeigt sich, dass, alleine durch die Anwesenheit einer der drei EGR-Faktoren, ein ähnlicher regulatorischer Effekt auf die *HOXA*-Transkription auftritt, wie bei der ektopen Expression von *IRX1* oder *IRX2*

(vgl. Abbildung 11). Vor allem die Gene *HOXA3*, *A4*, *A6* und *HOXA9* sind durch einen reprimierenden Effekt der EGR-Proteine betroffen, wohingegen die anderen *HOXA*-Gene keine Deregulierung aufwiesen. Alle EGR-Proteine hatten den gleichen Effekt auf die *HOXA*-Genexpression.

Da die EGR-Proteine in Anwesenheit von IRX1 übermäßig exprimiert werden, wurde zudem eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt, bei der überprüft wurde, ob die *EGR*-Gene direkte oder indirekte Zielgene des IRX1 darstellen. Hierzu wurden sowohl die Promotorregion als auch die erste Intronregion des *EGR1-3*-Chromatins auf eine Interaktion mit dem IRX1-Transkriptionsfaktors untersucht. Jedoch zeigte sich hier keine direkte Bindung, was für eine indirekte Regulierung der *EGR*-Gene durch IRX1 spricht (Daten nicht gezeigt).

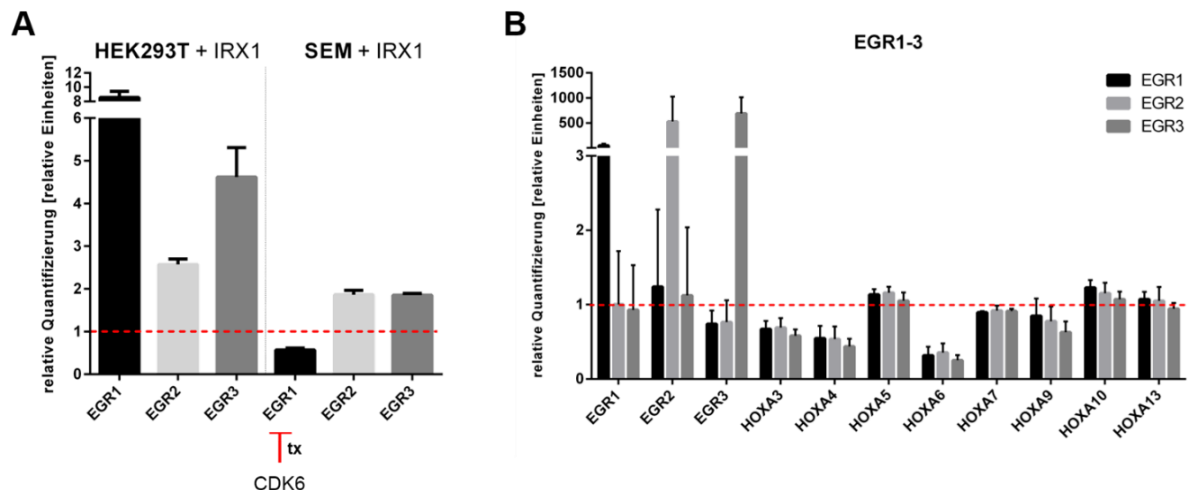


Abbildung 17: Darstellung der regulatorischen Effekte der EGR-Proteine auf die *HOXA*-Genexpression. (A) Relative Quantifizierung der Expressionslevel der *EGR*-Transkripte in HEK293T- und SEM-Zellen, denen eine ektope *IRX1*-Expression zugrunde lag. Bis auf die CDK6-abhängige Reprimierung des *EGR1* in SEM-Zellen werden alle anderen Gene im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen überexprimiert (siehe rote Linie). Als Normierungswert dienten Expressionslevel des Haushaltgens *GAPDH* (n=3, +S.E.M.). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. (B) Relative Quantifizierung der *HOXA*-Genexpression im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen der HEK293T-Zellen, die eine Integration der *EGR1-3*-cDNA in ihr Genom aufwiesen. Die Normierung der RT-PCR erfolgte auf das Haushaltgen *GAPDH*. Alle EGR-Proteine regulieren die *HOXA*-Gene in gleichem Maß. Lediglich die Gene *HOXA3*, *A4*, *A6* und *A9* (minimal) werden reprimiert. Die anderen *HOXA*-Gene wurden durch die EGR-Proteine nicht dereguliert. Als Vergleich dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionlevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3, +S.E.M.).

2.8 Direkte Aktivierung des *HOXB4* durch *IRX1* und Induktion des *HOXB4*-spezifischen Expressionsprogramms

Bei der Analyse des Genexpressionsprofils (GEO Acc. No. GSE75376) der transient transfizierten HEK293T-Zellen aus 2.1 ist ein weiteres interessantes Gen in den Fokus der experimentellen Untersuchungen gerückt: das *HOXB4*-Gen. Dieses Homöobox-Gen vermittelt eine gesteigerte Regenerationsrate hämatopoietischer Stammzellen und eine Expansion der HSC *ex* und *in vivo*. Hierbei wird jedoch die normale Differenzierung und auch die Transformierbarkeit der Zellen nicht beeinflusst (Antonchuk *et al.*, 2002; Sauvageau *et al.*, 1995). Das GEP aus Abbildung 9 zeigt zudem eine 8-fache (p-Wert: 0,00002) Erhöhung der Expression des *HOXB4*-Zielgens *TGFB1* (*Transforming growth factor beta 1*), was für eine funktionell aktive Überexpression des *HOXB4*-Gens sprechen könnte. Über RT-PCR-Versuche wurde der transkriptionelle Zusammenhang zwischen *HOXB4* und *IRX1* genauer untersucht. Hierzu wurden transgene HEK293T-Zellen, die das stabil inserierte *IRX1*, bzw. *MLL-AF4*, oder beide Transgene beinhalteten, für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Nach der Isolierung der zytoplasmatischen RNA und der Reversen Transkription in cDNA wurde die *HOXB4*-Transkription der jeweiligen transgenen Zellen im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen untersucht. Die Normierung der relativen Expression erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Die rote Linie zeigt das auf 1,0 gesetzte Level der Expression der Referenzzellen (Leervektor). Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe Abbildung 18, n=3, +S.E.M.).

Es zeigt sich, unabhängig von der Anwesenheit des *MLL-AF4*, eine gesteigerte Transkription des *HOXB4* durch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors *IRX1* (siehe Abbildung 18A). Weitere Versuche mit Oligonukleotiden für die Gene *NOV* (*Nephroblastoma overexpressed gene*) und *ERG* (*Avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related*) und *TGFB1*, die alle direkte Zielgene des *HOXB4* darstellen, wurden angeschlossen (Oshima *et al.*, 2011). Es zeigt sich hierbei, dass auch diese *downstream*-Zielgene durch die Anwesenheit des *IRX1* aktiviert wurden (siehe Abbildung 18B). Somit gewährleistet *IRX1* die Expression des *HOXB4* und die funktionell aktive Ausübung seiner Zielgenregulierung.

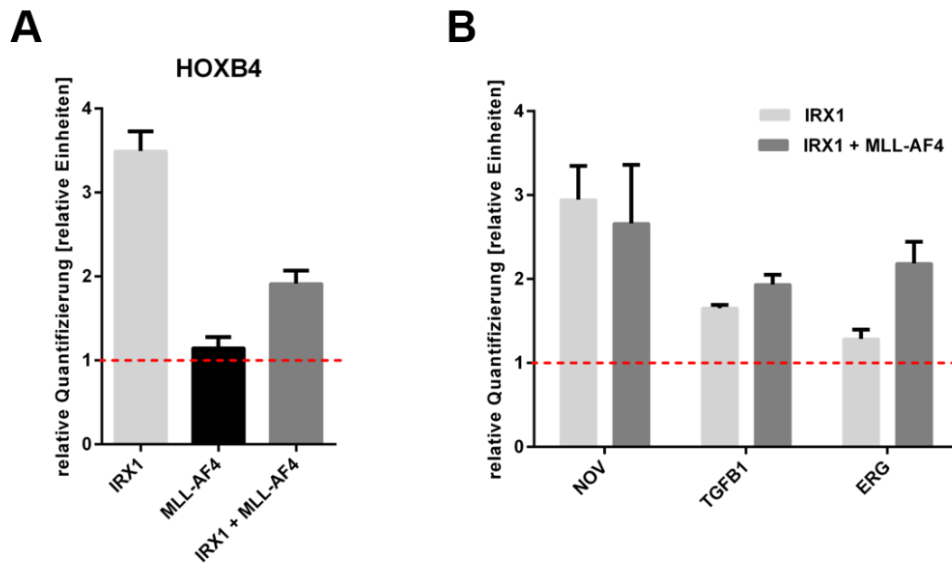


Abbildung 18: Aktivierung der *HOXB4*-Transkription und der Expression seiner Zielgene durch IRX1. Die Relative Quantifizierung der RT-PCR-Versuche erfolgte in stabil transfizierten HEK293T-Zellen, deren zytoplasmatische RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert wurde. Als Vergleich dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionlevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Als Normierung diente das Haushaltsgen *GAPDH*. Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3, +S.E.M.). **(A)** Relative Quantifizierung der *HOXB4*-Expression in Zellen mit einer ektope IRX1 und/oder einer ektope MLL-AF4-Expression. IRX1 bedingt eine MLL-AF4-unabhängige *HOXB4*-Überexpression. **(B)** Relative Quantifizierung der *downstream*-Zielgene des *HOXB4* von HEK293T-Zellen, denen die cDNA der *IRX1*- oder der *IRX1*- und *MLL-AF4*-Gene stabil integriert wurden. Die Transkription der Gene *NOV*, *TGFB1* und *ERG* wurde in der Anwesenheit von IRX1 bzw. IRX1 und MLL-AF4 überexprimiert. Als Vergleich dienten mit dem Leervektor transfizierte Zellen, deren Expressionlevel auf 1,0 gesetzt wurde (rote Linie). Als Normierung diente das Haushaltsgen *GAPDH*. Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3, +S.E.M.).

Zur genaueren Aufklärung der transkriptionellen Aktivierung des *HOXB4* durch Iroquois1, schlossen sich Chromatin-Immunpräzitationsversuche an. Die Expression des stabil inserierten IRX1 in HEK283T-Zellen wurde für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Um eine Lokalisation des IRX1-Transkriptionsfaktors am *HOXB4*-Promotor nachzuweisen, folgte nach der Doppelfixierung der Zellen und dem Scheren des Chromatins die Präzipitation mit anti-IRX1- und anti-IgG (Negativkontrolle)-Antikörpern. Als Kontrolle wurden zudem Oligonukleotide für den Bereich des ersten Introns generiert. Zudem wurden die Promotoren der Gene *MEIS1* und *HOXA9* analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden dieselben Versuche auch mit Leervektor-transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt. Abbildung 19 zeigt repräsentativ einen von drei Versuchen, gemessen in Triplikaten (+S.E.M.). Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte nach der „Percent Input Method“ von life Technologies (Thermo Fisher Scientific).

IRX1 bindet direkt an den Promotor und den Bereich des ersten Introns des *HOXB4*-Gens. Somit ist *HOXB4* ein direktes Zielgen des IRX1. Als Negativkontrolle diente die Präzipitation des IRX1 an der Promotorregion des *HOXA9*, da ja bereits in Abbildung 13 gezeigt wurde, dass IRX1 ohne das Vorhandensein von MLL-AF4 nicht an die Promotorregion der *HOXA*-Gene binden kann. Es zeigt sich demnach in Abbildung 19, dass IRX1 kein *HOXA9*-Chromatin gebunden hatte. Die Untersuchung der Promotor- und der Intronregion des *MEIS1*-Chromatins zeigte eine direkte Bindung des IRX1, die jedoch nicht so stark war, wie bei *HOXB4*. Somit ist neben *HOXB4* auch *MEIS1* ein direktes IRX1-Zielgen. Die Leervektorkontrollen (LV) waren bei allen CoIP-Versuchen ohne Signal.

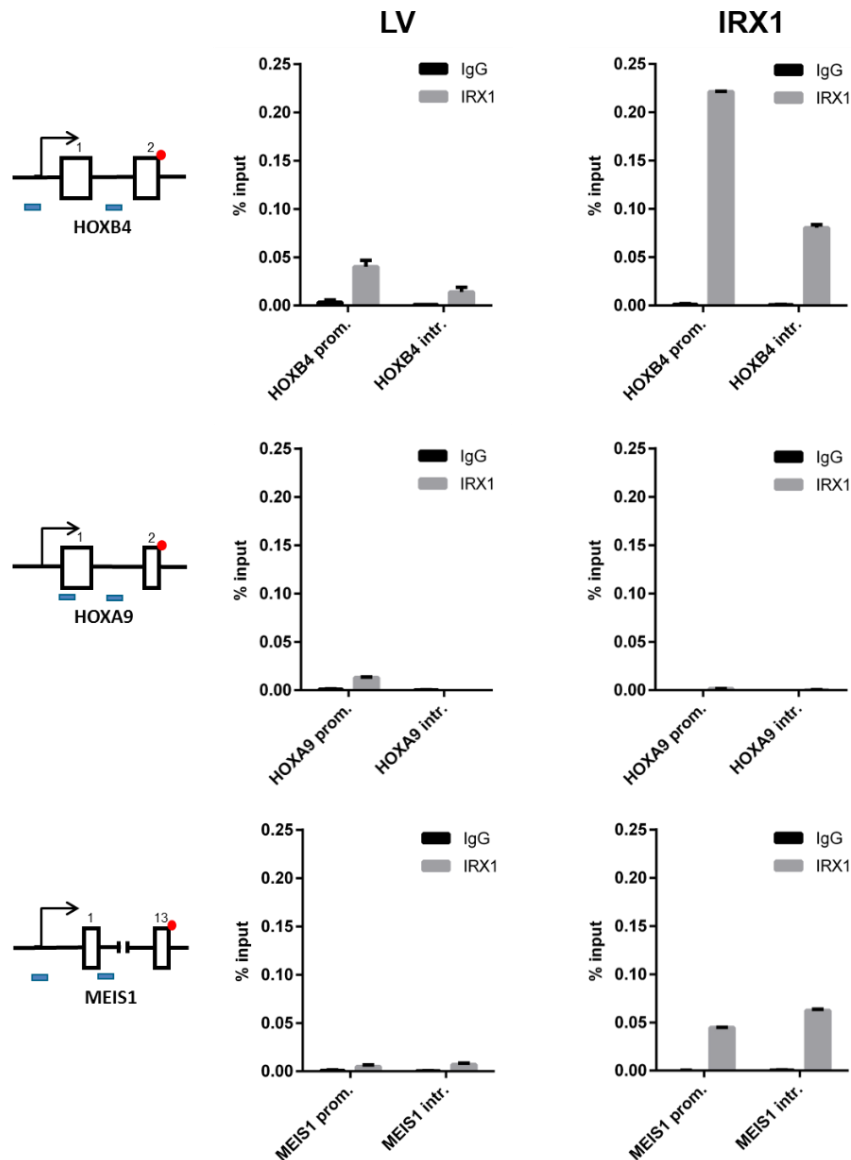


Abbildung 19: Identifizierung der direkten IRX1-Zielgene: *HOXB4* und *MEIS1*. Chromatin-Immunpräzipitationsversuche der Gene *HOXB4*, *HOXA9* und *MEIS1* mit Antikörpern gegen IRX1 und dem unspezifischen IgG (Negativkontrolle). Untersucht wurden die Promotorregion und ein Bereich des ersten Introns der jeweiligen Gene (schematische Darstellung links). Den stabil transfizierten HEK293T-Zellen wurde entweder das *IRX1*-Gen oder eine Leervektorkontrolle (LV) inseriert. Beide *HOXB4*- sowie *MEIS1*-Bereiche korrelieren mit einer hohen Menge an gebundenem IRX1. Am *HOXA9*-Locus konnte kein IRX1 präzipitiert werden. Die Auswertung des CHIP erfolgte nach der „Percent Input Method“ von life Technologies (Thermo Fisher Scientific). Die gezeigten Daten repräsentieren einen von drei Versuchen, gemessen in Triplikaten (+S.E.M.).

2.9 Negativergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden weitere Schnittstellen rund um die Effekte und die Auswirkungen des IRX1 analysiert. Bei den hier aufgeführten Experimenten hatte IRX1 im Vergleich zu den Kontrollen jedoch keinen differenzierten Effekt. Diese Daten dienen an dieser Stelle der Darstellung, in welchem Bereich IRX1 keinen regulatorischen Einfluss hat, um später ein klares Bild von den Zusammenhängen zu erhalten, bei welchen IRX1 tatsächlich relevant ist.

Nach der Transfektion der t(4;11)-Zelllinie SEM und der Validierung des reprimierenden Effekts des IRX1 auf die *HOXA*-Gene dieser Zelllinie wurde untersucht, ob IRX1 den Zellzyklus dieser Zellen beeinflusst. Da die *HOXA*^{low}-Patientengruppe durch eine aggressivere Form der t(4;11)-Leukämie charakterisiert wurde, sollte die Verteilung der einzelnen Phasen des Zellzyklus der IRX1-transfizierten SEM-Zellen im Gegensatz zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen überprüft werden. Zudem wurde eine Behandlung beider Zelllinien mit 300 nM TSA für 24 h durchgeführt. Es zeigte sich bei keiner der getesteten Bedingungen eine Veränderung der prozentualen Verteilung der G1-, G2- oder S-Phase. **Konklusion:** IRX1 beeinflusst den Zellzyklus oder das Wachstumsverhalten der Zellen nicht.

Gleichzeitig wurden Experimente mit denselben Zellen, die einer TSA-Exposition (100 nM) über 96 h ausgesetzt waren, durchgeführt. Um zu klären, ob *IRX1*-transfizierte Zellen besser oder schlechter auf eine Behandlung mit TSA ansprechen, wurde alle 24 h die Viabilität der Zellen gemessen. Allerdings verhielten sich beide Zelllinien exakt gleich. Somit verursacht IRX1 keinen Vor- bzw. keinen Nachteil während der Behandlung mit möglichen Therapeutika der Klasse der HDAC-Inhibitoren. **Konklusion:** IRX1 interferiert nicht mit der Administration von HDAC-Inhibitoren.

Des Weiteren wurde geklärt, ob IRX1 den Acetylierungsstatus des MENIN1, welches für die Rekrutierung des N-terminalen MLL-Teils an seine Zielgenpromotoren zuständig ist, ändert. Hierzu wurden CoIP-Experimente mit einem MENIN1-Antikörper durchgeführt und im Western Blot mit einem α -Acetyl-Lysin-Antikörper der Status der Acetylierung dieses Proteins überprüft. IRX1 beeinflusste den Acetylierungsgrad des MENIN1 jedoch nicht.

Wie bereits in 2.5 beschrieben, wurde zur Aufklärung einer direkten Interaktion des IRX1 mit HDAC1, MENIN1 oder LEDGF eine CoIP durchgeführt. Da HDAC1 und IRX1 durch die Behandlung mit TSA aus dem MLL-AF4mCH-Komplex dissoziieren, lag die Vermutung nahe, dass beide direkt miteinander interagieren. Die Western Blot-Versuche bestätigten jedoch keine direkte Bindung des IRX1 mit den untersuchten Proteinen.

Konklusion: IRX1 interferiert nicht mit der N-terminalen Bindung von MENIN1 und LEDGF an MLL oder MLL-AF4.

Bei der Analyse der *EGR1-3*-Konstrukte und deren Effekt auf die *HOXA*-Genexpression wurden ChIP-Experimente angeschlossen, die klären sollten, ob die Überexpression des *EGR1-3*-Gene mit einer direkten Interaktion mit IRX1 einhergeht. Der IRX1-Antikörper konnte jedoch kein Chromatin der *EGR*-Promotorregion co-präzipitieren, was für eine indirekte Regulierung dieser Gene in Anwesenheit des IRX1 spricht.

Frühe Experimente dieser Doktorarbeit untersuchten mit Hilfe von Luciferase-Assays die Promotoraktivität des *MLL*-Gens in der Anwesenheit von IRX1. Hierzu wurden drei verschiedene Längen des *MLL*-Promotorbereichs vor das Luciferasegen kloniert, wobei die längste Variante sogar das IRX1-Bindemotiv aufwies, und in HEK293T-Zellen transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der EF1 α -Promotor verwendet. Jedoch zeigte sich durch die Anwesenheit des IRX1 in den Zellen keine signifikante Reduktion oder Steigerung der Luciferase-/Promotoraktivität.

Neben den *IRX1*- und *IRX2*-Genen wurde auch das *IRX3*-Gen in Bezug auf eine mögliche *HOXA*-Genregulierung untersucht. Hierzu wurde die cDNA eines FLAG-markierten *IRX3* in den *Sleeping Beauty*-Vektor kloniert und in das Genom von HEK293T-Zellen stabil integriert. Die Expression des Transgens erfolgte für 48 h nach der Zugabe von 1 μ g/ml Doxycyclin. Als Referenzzellen wurden mit dem Leervektor transfizierte HEK293T-Zellen verwendet. Nach der Isolierung der zytoplasmatischen RNA und der Reversen Transkription in cDNA, folgten RT-PCR-Versuche mit Oligonukleotiden, die die *HOXA*-Gene (*HOXA3-13*) amplifizierten. IRX3 hatte jedoch, im Gegensatz zu IRX1 und IRX2, keinen reprimierenden Effekt auf die *HOXA*-Gene.

2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufklärung der regulatorischen und proteinbiochemischen Interaktionen des IRX1 im Kontext einer t(4;11)-Leukämie

Die Experimente dieser Doktorarbeit dienten der Aufklärung der Relevanz und der Aufgaben des Iroquois1 im Kontext einer t(4;11)-basierten Leukämie. Durch die Etablierung der stabilen Transfektion von leukämischen Zellen war es zudem erstmals möglich, genmanipulative Versuche auch in einem physiologischen Umfeld nachzustellen. Abbildung 21 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit kurz zusammen und ordnet diese in ein Modell ein, bei dem IRX1 unter anderem das Stammzellprogramm der t(4;11)-Patienten ändert und bei dem weitere Erkenntnisse der aktuellen Literatur mit einbezogen sind.

Somit lässt sich zusammenfassen:

- IRX1 aktiviert direkt die *HOXB4*- und indirekt die *EGR1-3*-Expression.
- IRX1 reprimiert direkt die *MEIS1*-Expression.
- IRX1 stört durch direkte Interaktion mit dem MLL-AF4-Komplex dessen transkriptionsfördernde Eigenschaften (siehe *ALOX5*- und *HOXA*-Gene).
- Eine Behandlung mit HDACi führt zu einer Dissoziation des IRX1 aus dem MLL-AF4mCH-Komplex. Zudem dissoziiert das MLL-AF4mCH vom Promotor seiner Zielgene und das endogene MLL wird rekrutiert. Zwar stört IRX1 die Dissoziation des MLL-AF4mCH, jedoch führt die Behandlung aller untersuchten Zelllinien zu einer Normalisierung der *HOXA*-Genexpression.
- IRX1 ist verantwortlich für die Repression der *HOXA*-Gene des HOXA^{low}-Patientenclusters, sowohl in der An- als auch Abwesenheit des MLL-AF4.

3 DISKUSSION

Die Diagnose einer akuten pädiatrischen Hochrisikoleukämie des Lymphatischen Systems geht am häufigsten einher mit einer Translokation der Gene *MLL* und *AF4*. Durch diese reziproke Translokation entstehen zwei chimäre Proteine, das MLL-AF4 und das AF4-MLL. Die Erforschung der Induktion und der Progression einer t(4;11)-basierten Leukämie ist bis zum heutigen Zeitpunkt gut vorangeschritten. So ist bekannt, dass die chimären Proteine mit dem N-terminalen Teil des MLL hauptsächlich für die Leukämieentstehung zuständig sind, jedoch zeigte ein Mausmodell auch, dass selbst der reziproke Teil alleine fähig ist, eine Leukämie auszulösen (Bursen *et al.*, 2010b). Bis 2009 war es zudem eine weitverbreitete Meinung, dass MLL-assoziierte Leukämien mit einer Überexpression der *HOXA*-Gene einhergehen und diese aberranten Expressionen hauptsächlich für die Entstehung entarteter Zellen verantwortlich sind. Die Forschung und die Aufklärung des Transkriptionsfaktors IRX1 im Kontext einer t(4;11)-basierten Leukämie während dieser Doktorarbeit und der vorangegangenen Bachelor- und Masterarbeit wurden auf Publikationen aufgebaut, die zeigen konnten, dass es MLL-AF4-Patienten gibt, die keine aberrante *HOXA*-Expression aufweisen. Diese Patientenkohorte korrelierte zudem mit einer schlechteren Prognose und Therapierbarkeit. Allen *HOXA*^{low}-Patienten ist zudem gemein, dass sie eine Überexpression des *IRX1* aufweisen, die im Gegensatz zu den *HOXA*^{high}-Patienten nicht vorhanden ist (Trentin *et al.*, 2009). Somit war und ist es von besonderem Interesse, dass die Relevanz und die Fähigkeit des IRX1 im Kontext einer MLL-AF4-basierten Leukämie aufgeklärt werden. Eventuelle Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer Medikationen oder die Entstehung und die Entwicklung einer *HOXA*^{low}-charakterisierten t(4;11)-Leukämie könnten somit identifiziert werden.

3.1 Der Einfluss des Transkriptionsfaktors IRX1 auf die *HOXA*-Genexpression in t(4;11)-basierten Leukämien

Die *HOX*-Gene stellen Transkriptionsfaktoren dar, die die frühe Zellidentität und auch spätere Prozesse, wie die Hämatopoiese, determinieren. Eine Deregulierung dieser Prozesse führt zu einer Vielzahl an Malignitäten, unter anderem zu Akuten Myeloischen und Akuten Lymphatischen Leukämien. Hier weisen die *HOX*-Gene die Fähigkeit auf, Zellen zu immortalisieren, was zu einer Akkumulation entarteter Zellen und somit zu Krebs führt (Alharbi *et al.*, 2013).

Die ersten Ergebnisse, die die Grundlage dieser Arbeit bilden, beinhalten die Validierung der DNA-Microarray-Daten in Bezug auf die Deregulierung der *HOXA*-Gene in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors IRX1 und die Rolle von MLL-AF4 in diesem Kontext. Diese Validierung fand sowohl in der Zelllinie HEK293T (embryonale Nierenzellen) als auch in der leukämischen Zelllinie SEM (B-Zell-Vorläuferzelle mit t(4;11)) statt. Bei den HEK293T-Zellen konnte der Einfluss des IRX1 alleine und auch im Zusammenhang mit MLL-AF4 untersucht werden. Die Auswertung der RT-PCR-Daten in Abbildung 11 zeigt deutlich, dass die ektope Expression des IRX1 zu einer Reprimierung der *HOXA*-Gene führt. Ebenso überwiegt der reprimierenden Effekt des IRX1 auf diese Gene, selbst wenn MLL-AF4, welches alleine für eine Überexpression der *HOXA*-Gene zuständig ist, vorhanden ist. Bei der ektope Expression des IRX1 in der physiologischen Zelllinie SEM, die bereits eine t(4;11)-Translokation trägt und somit die chimären Proteine MLL-AF4 und AF4-MLL exprimiert, zeigte sich das gleiche Bild (siehe Abbildung 16). Somit lässt sich zusammenfassen, dass IRX1 den regulatorischen Effekt des MLL-AF4 auf die *HOXA*-Gene unterdrückt und zu einer IRX1-typischen Repression dieser Gene führt. Diese Ergebnisse identifizierten den ersten Effekt des IRX1 im Kontext einer t(4;11): IRX1 agiert dominant-negativ auf die Expressionsrate der MLL-AF4-Zielgene *HOXA3-13*. Des Weiteren lässt sich festhalten, dass IRX1 für das in der *HOXA*^{low}-Patientenkohorte spezifische Expressionsmuster der *HOXA*-Gene verantwortlich ist.

Bei der näheren Betrachtung des deregulierenden Effekts des IRX1 auf die *HOXA*-Gene zeigte sich, dass nicht alle *HOXA*-Gene gleich stark reprimiert wurden. Den stärksten regulatorischen Effekt hatte IRX1 auf *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA6* und *HOXA9*. Den geringsten bis keinen regulatorischen Effekt hatten IRX1 und auch MLL-AF4 auf *HOXA7*. Dieser Trend war sowohl bei den transfizierten HEK293T als auch bei den SEM-Zellen erkennbar (siehe Abbildung 11 und Abbildung 16). Bei der Auswertung der *HOXA*^{low}-Patientenkohorte wiesen vor allem die Gene *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9* und *HOXA10* eine starke Reprimierung auf (Trentin *et al.*, 2009). Bereits publizierte Daten von myeloischen Progenitorzellen belegten, dass *HOXA7*, neben *HOXA9*, essentiell für die Transformierbarkeit ist (Ayton, 2003). In lymphatischen Zellen konnte diese Relevanz des *HOXA7* nicht bestätigt werden. Die Auswertung von MLL-AF4-positiven Patientenzellen in Bezug auf deren Genexpression verdeutlichte, dass, im Gegensatz zu der Überexpression von *HOXA9*, nicht alle Patienten eine Überexpression des *HOXA7* aufweisen und SEM-Zellen ebenfalls eine geringere Deregulierung des *HOXA7* in der *Heatmap* zeigen (Guenther *et al.*, 2008).

Bei der Untersuchung der GEPs verschiedener ALL-Subtypen aus eine Kohorte von 360 ALL-Patienten wies eine Gruppe MLL-rearrangierter ALL eine exklusive Überexpression

der Gene *HOXA9* und *MEIS1* auf. In den T-ALL, BCR-ABL oder TEL-AML1 Subgruppen wies keines dieser Gene eine Deregulierung auf (Yeoh *et al.*, 2002). Dies spricht für eine direkte Involvierung dieser beiden Gene in die MLL-vermittelte Leukämieentstehung. Zudem belegten Armstrong *et al.*, dass vor allem die Gene *HOXA4*, *HOXA5* und *HOXA9* in MLL-basierten ALL-Patienten überexprimiert werden, wohingegen *HOXA7* keinen Expressionsunterschied aufweist (Armstrong *et al.*, 2002). Somit ist es nicht unphysiologisch, dass durch die Nachahmung einer t(4;11)-ALL in HEK293T und auch in der B-Zell ALL-Zelllinie SEM keine Deregulierung des *HOXA7* festzustellen war.

Bisherige Studien belegten die hohe Relevanz der überexprimierten *HOXA*-Gene in MLL-rearrangierten Leukämien und im speziellen bei t(4;11)-Translokationen. Gemäß dem aktuellen Stand der Forschung auf diesem Gebiet scheint vor allem die Expression des *HOXA9* und des *MEIS1* einen enormen Einfluss auf die Onkogenese zu haben. Umso interessanter war die Charakterisierung eines neuen t(4;11)-Clusters, der sich aufgrund seiner fehlenden *HOXA*-Expression von den bisherigen ALL-Charakterisierungen dieser Subgruppe abhebt. Die entsprechende Patientenkohorte korrelierte zudem mit einer höheren Sterblichkeit nach 5 Jahren. Die Gruppe der *high-risk*-Patienten mit einem EFS von 20 % ± 7 % beinhaltete 7 von 30 Patienten der *HOXA*^{high}-Kohorte und 23 Fälle, die durch eine Expression des *IRX1* und einer *HOXA*^{low} charakterisiert waren (Kang *et al.*, 2012; Trentin *et al.*, 2009).

Neben der Beeinflussung der *HOXA*-Gene durch den Transkriptionsfaktor *IRX1* zeigte sich in SEM-Zellen auch eine Reprimierung der Gene *MEIS1* und *BCL2*. *MEIS1* ist im Zusammenspiel mit *HOXA9*, wie oben bereits erwähnt, für die maligne Transformation zu Leukämiezellen essentiell und in den meisten ALL überexprimiert. In hämatopoietischen Progenitor- und Leukämiezellen korreliert die Expression von *HOXA9* mit einer Expression von *MEIS1*. Diese indirekte Regulierung des *MEIS1* durch *HOXA9* ist über *Creb1* und *Pknox1* gesteuert (Hu *et al.*, 2009). Somit liegt es auf der Hand, dass eine Reprimierung der *HOXA9*-Expression ebenfalls in einer Reprimierung der *MEIS1*-Expression resultiert.

BCL2 fungiert innerhalb des intrinsischen Apoptosewegs als regulatorisches Protein, welches anti-apoptotische Prozesse aktiviert. MLL-AF4 aktiviert über die DOT1L-vermittelte H3K79_{me2/3} die spezifische Expression des *BCL2*, was zu einer verminderten Apoptoserate und zu einer stetigen Proliferation der Leukämiezellen führt (Benito *et al.*, 2015; Czabotar *et al.*, 2014). Durch die Expression des *IRX1* wird die Expression dieser beiden MLL-AF4-typischen Zielgene vermindert. Es werden keine *HOXA*-Gene mehr exprimiert, die Apoptose wird nicht mehr durch die Expression des *BCL2* gestört und

MEIS1 wird vermindert exprimiert. Alle diese Faktoren dienen der Initiierung und der Progression einer MLL-AF4-spezifischen ALL, die besonders durch ihre hohe Aggressivität und ihre schwere Therapierbarkeit gekennzeichnet ist. Durch das Vorhandensein des IRX1 wird nicht, wie sich zunächst vermuten lässt, diese Form der Leukämie abgeschwächt. Stattdessen korreliert eine höhere Sterblichkeit der Patienten mit einer ektopten *IRX1*-Überexpression (Kang *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2010). Hieraus lässt sich ein weiterer Effekt des IRX1 im Kontext einer t(4;11)-Leukämie formulieren: IRX1 steigert die Aggressivität der Erkrankung trotz der Regulierung essentieller Treiber der Leukämogenese. IRX1 bedingt somit einen neuen Krankheitsmechanismus mit konträren Expressionsmustern im Vergleich zu den MLL-AF4-typischen Genexpressionsprofilen. Diese sind eventuell durch eine IRX1-abhängige Arretierung der MLL-AF4-Onkoproteine an ihre Zielgenpromotoren erklärbar. Dadurch wird die Rekrutierung des endogenen MLL verhindert, welche normalerweise zu einer physiologischen Expression dieser Zielgene führen würde.

3.2 Der MLL-AF4-Multiproteinkomplex wird durch IRX1 erweitert: Die Folgen einer Inkorporation auf molekularbiologischer Ebene

Vorangegangene Arbeiten bestätigten, dass IRX1 den regulatorischen Effekt des MLL-AF4-Komplexes auf seine Zielgene, wie die *HOXA*-Gene, hemmt. So wurde untersucht, ob IRX1 die Formierung des MLL-AF4-Komplexes beeinflusst und/oder die Regulierung der Zielgene determiniert.

Durch CoIP-Versuche wurde die Zusammensetzung des MLL-AF4mCH-Komplexes im Hinblick auf gängige regulatorische Proteinpartner analysiert. Da IRX1 die Effekte des MLL-AF4 aufhebt bzw. sogar umkehrt, wurde überprüft, ob IRX1 die Zusammensetzung des Multiproteinkomplexes stört. Jedoch zeigte sich bei der Affinitätsaufreinigung des mit *mCherry*-markierten MLL-AF4-Komplexes durch die Anwesenheit des IRX1 kein Unterschied in der Fähigkeit, wichtige Bindepartner zu rekrutieren. Die CoIP-Experimente bestätigten jedoch die Vermutung, dass IRX1 direkt mit dem MLL-AF4mCH-Komplex interagiert und ein Teil des MLL-AF4 Multiproteinkomplexes wird (siehe Abbildung 12).

Durch die angeschlossenen ChIP-Experimente konnte der regulatorische Effekt des IRX1 im Hinblick auf die Interaktion des MLL-AF4mCH-Komplex mit seinen Zielgenen untersucht werden. Über ChIP können direkte Interaktionen von DNA-bindenden Proteinen mit dem Chromatin bestimmter Bereiche nachgewiesen werden. Die MLL-AF4-

Zielgene *HOXA9* und *HOXA10* wurden hier innerhalb ihrer Promotorregionen genauer untersucht. Wie zu erwarten war, wurde durch die Aufreinigung des MLL-AF4mCH eine hohe Menge des Chromatins der beiden *HOXA*-Promotoren aufgereinigt. Eine Bindung des IRX1 an diese Promotoren konnte nur im Zusammenhang mit MLL-AF4mCH erreicht werden (siehe Abbildung 13). Dies spricht für die zuvor beschriebene Inkorporation des IRX1 in den MLL-AF4-Komplex. Jedoch bleibt weiterhin die Frage im Raum, wie es möglich ist, dass auch IRX1 alleine einen reprimierenden Effekt auf die *HOXA*-Gene haben kann, obwohl es nicht direkt an die Promotoren bindet. Ebenso ändert das Vorhandensein des IRX1 in den Zellen die Bindefähigkeit des MLL-AF4mCH an seine Zielgenpromotoren nicht. Aufgrund dieser Erkenntnis gilt es zu diskutieren, welchen Mechanismus IRX1 benutzt, um eine Deregulierung der *HOXA*-Gene zu bewirken. Hier muss es zumindest zwei verschiedene Varianten geben. Zum einen wird IRX1 direkt in den Komplex des MLL-AF4mCH rekrutiert und ist demnach in direkter Nähe der Promotorregion lokalisiert, um eine Verminderung der Transkription einzuleiten, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass kein MLL-AF4 in den Zellen vorhanden ist. Hierbei ist IRX1 nicht an den Promotoren zu finden und vermittelt trotz dessen eine Repression der *HOXA*-Gene. Somit werden wahrscheinlich in beiden Fällen Kaskaden durch IRX1 ausgelöst, die vor allem die Transkription der *HOXA*-Genen stören. So ist es denkbar, dass durch angeschlossene Untersuchungen auf Basis des GEP: GEO Acc. No. GSE75376 weitere direkte Zielgene des IRX1 identifiziert werden können, die eine Reprimierung der *HOXA*-Gene hervorrufen und eine Verbindung zu regulatorischen Kaskaden herstellen. Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass auch *EGR1-3* eine Reprimierung der *HOXA*-Gene vermitteln, jedoch wurde die Expression der *EGR*-Gene nicht direkt durch IRX1 reguliert.

Eine weitere Eigenschaft des IRX1 legten die ChIP-Versuche mit dem HDAC-Inhibitor TSA dar. So zeigt sich normalerweise durch eine Behandlung mit HDACi eine Dissoziation des MLL-AF4-Komplexes weg von seinen Promotoren (Ahmad *et al.*, 2014). Die Anwesenheit des IRX1 änderte dieses Verhalten jedoch und führte zu einer Stabilisierung des MLL-AF4mCH an den Promotorregionen der beiden untersuchten *HOXA*-Gene. Dies bestätigt, dass IRX1 gerade bei Behandlungen, die für die Krebstherapie in Frage kommen, den angestrebten Effekt nicht erzielt oder stört. Das bedeutet, dass auch andere in der Chemotherapie verwendete Substanzen durch das Vorhandensein des IRX1 nicht oder mit einem anderen Mechanismus wirken könnten. Zwar konnte der Mechanismus der *HOXA*-Reprimierung in der Anwesenheit des IRX1 nicht aufgeklärt werden, jedoch vermitteln die Experimente eine Idee darüber, warum die IRX1-assoziierte t(4;11)-Leukämie als äußerst aggressiv eingestuft wird.

3.3 Einblicke in den Fortschritt der pharmakologischen Inhibierung MLL-r-assoziiierter Faktoren

3.3.1 HDAC-Inhibitoren

Einige Experimente dieser Arbeit wurden unter Verwendung des pan-HDAC-Inhibitors Trichostatin A durchgeführt. Diese Substanz ist einer der ersten beschriebenen natürlich vorkommenden Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) und inhibiert direkt die Klassen I, II und IV der Histondeacetylasen (Bolden *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 1990).

Epigenetische Prozesse, wie posttranslationale Acetylierungen von Lysinen, Phosphorylierungen von Serinen oder auch Methylierungen von Lysinen oder von Argininen der Histone, sind wichtige Prozesse, um ein spezifisches Genexpressionsprofil einer Zelle zu erhalten und weiterzugeben. Histone verpacken das Chromatin in strukturierte, dynamische Einheiten und erhalten den gewebespezifischen Histon-Code. Die beiden Enzyme HAT (Histonacetylase) und HDAC (Histondeacetylase) steuern hauptsächlich den Acetylierungsgrad der Lysine an Histonen. HAT neutralisieren, durch Acetylierung der Lysine, die positive Ladung der Histonproteine und ermöglichen der negativ geladenen DNA eine Öffnung in das sogenannte Euchromatin. Hierdurch nimmt die DNA eine transkriptionsfördernde Konformation an. HDAC bewirken die Entfernung dieser Histonacetylierungen, wodurch sich Histone und DNA wieder annähern und eine Transkription durch das Heterochromatin verhindert wird (*gene silencing*). Die im Nukleus befindlichen HDAC gehören der Klasse I, II (Zn^{2+} -abhängig) und der Klasse III (NAD^{+} -abhängig) an. Der pan-HDAC-Inhibitor TSA fängt Zn^{2+} ab und verhindert damit die Aktivierung der HDAC der Klassen I, II und IV. Die katalytische Aktivität der Sirtuine der Klasse III sind hingegen unabhängig von Zinkionen und bleiben in der Anwesenheit von TSA aktiv (Dokmanovic *et al.*, 2007; Khan und La Thangue, 2012; Marks, 2010). Durch die Inhibierung der HDAC bleiben die Histonacetylierungen bestehen, wodurch das Euchromatin weiterhin offen bleibt und DNA-bindende Proteine die Transkription regulieren können. Korrekterweise sollten HAT/HDAC besser KAT (Lysinacetylase) und KDAC (Lysinacetylase) genannt werden, denn sie regulieren neben Histonen auch den Acetylierungsstatus von Proteinen und Komplexen, die unter anderem die Proliferation, die Migration, die Apoptose oder die Expression von Tumorsuppressoren, wie z.B. p53, steuern. Insgesamt können im humanen System bis zu 1750 Proteine an ihren Lysinresten acetyliert werden (Choudhary *et al.*, 2009; Dokmanovic *et al.*, 2007; Khan und La Thangue, 2012).

Da Krebserkrankungen häufig mit einer aberranten Genexpression einhergehen, werden HDAC-Inhibitoren als Therapeutika stark diskutiert. Histondeacetylasen sind zwar über das gesamte Chromatin hinweg verteilt, HDACi ändern jedoch nur einen Anteil von etwa 2-10 % der Genexpression in transformierten Zellen. So beeinflusste TSA in Untersuchungen von lymphatischen Zellen lediglich 2 % der 340 exprimierten Gene (Marks, 2010; Van Lint *et al.*, 1996). Die Behandlung von CEM-Zellen mit Vorinostat oder Romidepsin führte zu einer deregulierten Expression von 22-24 % aller Gene nach einer Inkubationszeit von 16 h (Peart *et al.*, 2005).

HDAC-Inhibitoren vermitteln den Zelltod durch die Beeinflussung des Zellzyklus, des DNA-Reparaturmechanismus oder der Mitose. In diesem Zusammenhang wurden und werden Zellkultur-Versuche, Tiermodelle sowie Klinische Studien durchgeführt, die den Benefit dieser Inhibitoren besser charakterisieren sollen (Khan und La Thangue, 2012). Bei einigen Krebserkrankungen sind HDAC-Inhibitoren bereits als Medikamente zugelassen, wohingegen sie im Gebiet der Leukämie erst in den letzten Jahren an Relevanz gewonnen haben.

Vorklinische Studien bestätigten, dass eine gleichzeitige Behandlung mit Etoposid und Vorinostat einen synergistischen bis additiven Effekt auf die negative Beeinflussung des Zellzyklus in AML- und CML-Zelllinien hat. (Shiozawa *et al.*, 2009). Vor allem in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, wie z.B. Etoposid oder Doxorubicin, zeigte der Einsatz von HDACi wie z.B. Romidepsin (FK228), einen additiven Effekt auf die Inhibierung der Proliferation von Leukämie- und Lymphomzellen (Kano *et al.*, 2007). Als Monotherapie war Vorinostat in eine Phase II-Studie an 37 AML-Patienten leider erfolglos (Schaefer *et al.*, 2009). In Amerika sind Vorinostat und Romidepsin bereits bei CTCL (kutanes T-Zell Lymphom) zugelassen und weisen bei dieser Erkrankung in Form einer Monotherapie eine Ansprechrate von jeweils ca. 30 % auf (Duvic *et al.*, 2007; Khan und La Thangue, 2012; Olsen *et al.*, 2007; Whittaker *et al.*, 2010, www.fda.gov/Drugs). Es hat sich jedoch herausgestellt, dass HDAC-Inhibitoren in Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika größere Erfolge aufweisen, als in Monotherapien. Bei MDS- oder AML-Patienten führte die Kombination aus HDACi mit 5-Azacytidin oder ATRA (*all-trans* Retinsäure, Tretinoin) zu einem additiven Effekt (Gore *et al.*, 2006; Kuendgen *et al.*, 2006).

In ER⁺-Brustkrebspatientinnen wurde in einer randomisierten, doppelblind geführten Phase IIb-Studie, die zusätzliche Gabe von Entinostat zu der Exemestan-Basis-Medikation gut vertragen und führte zu einem OS von 28,13 Monaten im Vergleich zu 19,84 Monaten in der Placebogruppe (Yardley *et al.*, 2013). Die p53- und NF-κB-

Expression konnten zudem durch HDAC-Inhibitoren verringert und die Regulierung nachgeschalteter Gene unterbrochen werden. Zudem zeigten HDACi der Klasse-I eine Induktion der Seneszenz in Pankreaskarzinomzellen (Schäfer *et al.*, 2017).

Im Zusammenhang mit t(4;11)-Leukämien wurden HDACi über *connectivity mapping* als potenzielle Kandidaten für eine Behandlung beschrieben. Die Applikation von TSA auf SEM-Zellen wies nach 6 h und 24 h eine Reprimierung der *HOXA*-Überexpression von 20-50 % auf. Aber auch weitere Gene, wie *RUNX1* und *MYC*, wurden durch HDACi gehemmt. Zudem bewirkte der HDACi TSA eine dosisabhängige Reduktion der Viabilität von MLL-rearrangierten Zellen, wohingegen normale Knochenmarkzellen unaffektiert blieben (Stumpel *et al.*, 2012). Zwar konnten Experimente im Rahmen dieser Doktorarbeit die zytotoxische Eigenschaft des TSA auf SEM-Zellen bestätigen (Daten nicht gezeigt), jedoch zeigte sich, dass durch die Benutzung einer tolerierbaren Menge TSA in den Zellen (100 nM-300 nM) ein weiterer Effekt des TSA zum Tragen kam. So konnten ChIP-Experimente zeigen, dass TSA direkt zu einer Dissoziation des chimären MLL-AF4mCH von den *HOXA9*- und den *HOXA10*-Promotoren führt und stattdessen das wt-MLL an den Promotor rekrutiert (siehe Abbildung 13). Dies hat zur Folge, dass sich die *HOXA*-Expression normalisiert und selbst die durch IRX1 vermittelte Repression der MLL-AF4-Zielgene aufgehoben wird (siehe Abbildung 15). Dass HDACi zu einer Dissoziation des chimären Proteins führen, wurde bereits durch Ahmad *et al.* mit Hilfe des HDACi Apicidin beschrieben. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch der *ALOX5*-Promotor und nicht die *HOXA*-Promotoren untersucht (Ahmad *et al.*, 2014). Zudem bewirkte die Applikation von TSA eine Dissoziation des IRX1 und HDAC1 aus dem MLL-AF4mCH-Komplex (siehe Abbildung 14). Diese Daten zeigen deutlich, dass TSA als Therapeutikum in einer t(4;11)-vermittelten ALL Erfolg haben könnte, da sich der Effekt speziell auf die MLL-assoziierten ALL-Zellen auswirkt und die Funktion des endogenen wt-MLL, welches für die Zellen essentiell ist, nicht beeinflusst wird. Vielmehr werden die Auswirkungen des chimären Proteins revertiert und das physiologische Expressionslevel der MLL-Zielgene wiederhergestellt. Das bedeutet, dass selbst bei entarteten Zellen, die nicht durch den zytotoxischen Effekt des TSA eliminiert werden, durch epigenetische Umprogrammierung eine „Umwandlung“ in weniger aggressive oder sogar „normale“ Zellen stattfinden könnte. Dies hätte zur Folge, dass eine effektivere Behandlung der t(4;11)-ALL in Kombination mit TSA und den klassischen Chemotherapien möglich wäre und somit die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls verringert würde. Es scheint hier zwei Wege zu geben, die wahrscheinlich zu einer Normalisierung der *HOXA*-Expression führen. So wird das chimäre Proteine in t(4;11)-Zellen ohne IRX1 verdrängt und das endogene MLL rekrutiert. Durch die Anwesenheit des IRX1 verbleibt MLL-AF4 an den Promotoren, besitzt dann

jedoch einen reprimierenden Charakter und das, obwohl HDAC1 von der Repressionsdomäne des MLL-N dissoziiert. Dies unterstützend haben Arbeiten von Xia *et al.* gezeigt, dass TSA eine durch HDAC1 vermittelte Repression verhindert (Xia *et al.*, 2003). TSA reguliert zudem die Expression des murinen *Hdac1*, was zunächst in einer vermehrten Expression dieses Gens resultiert. Durch die Rekrutierung des *Hdac1* an seinen eigenen Promotor wird wiederum das Stilllegen (*silencing*) des eigenen Gens vermittelt (Schuettengruber *et al.*, 2003). Dieser Mechanismus könnte erklären, warum nach der TSA-Applikation in den CoIP-Versuchen keine Präzipitation des HDAC1 mehr möglich war. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die geringere Menge des HDAC1 in der Zelle an andere Bereiche oder Proteine rekrutiert wurde und somit dem MLL-AF4mCH nicht mehr zur Verfügung stand.

Der genaue Wirkmechanismus der HDAC-Inhibitoren bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Im Fall der MLL-AF4-IRX1-abhängigen ALL scheint zumindest die Komplexbildung durch TSA gestört und das Verhalten der rekrutierten Proteine im Bereich der *HOXA*-Promotoren beeinflusst zu werden.

Die MLL-Fusionsproteine rekrutieren zum Teil Schlüsselkomponenten, die für die Transformation und die Aktivierung der MLL-Zielgene essentiell sind. Diese Komponenten stellen unter anderem Faktoren der transkriptionellen Elongationsmaschinerie und deren Regulatoren dar, wie zum Beispiel AF4, p-TEFb oder DOT1L. Die Inhibierung dieser Targets durch kleine Moleküle ist neben der Entwicklung von HDACi in den Fokus der Therapieentwicklung für MLL-r-Patienten gerückt.

3.3.2 MENIN1-Inhibitoren

Das MENIN1-Protein interagiert direkt mit dem N-terminalen Teil des MLL und vermittelt eine Interaktion des MLL-Proteinkomplexes mit seiner Zielgen-DNA. Durch Inhibierung dieser Interaktion wird verhindert, dass das MLL-Fusionsprotein eine fehlerhafte Regulierung seiner Zielgene, z.B. Überexpression der *HOXA*-Gene, durchführen kann. MENIN1-Inhibitoren besetzen den Kern der hMBM Erkennungsstelle des MENIN und mimen eine MLL-Bindung (Cierpicki und Grembecka, 2014). Es konnte durch *in vitro*-Versuche bestätigt werden, dass die beiden Inhibitoren MI-1 und MI-2 eine MLL-X-induzierte Transformation über die Dissoziation des MENIN1 vom MLL-N-Teil und eine daraus resultierende Repression der *HOXA9*- und *MEIS1*-Gene erzielen kann. Zudem sind die beiden Inhibitoren in der Lage, Apoptoseprozesse und einen Proliferationsstop in leukämischen, MLL-rearrangierten Zellen zu induzieren (Grembecka *et al.*, 2012). Die

Inhibitoren MI-463 und MI-503 führen ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptoserate und einer Repression der *HOXA9*- und *MEIS1*-Expression. In *in vivo*-Experimenten konnten sie zudem die MV4;11-Tumorvolumina um 80 % verringern und führten bei zwei Mäusen zu einer vollkommenen Remission der Leukämie. Eine verlängerte Behandlungszeit von 38 Tagen führte zu keiner gesteigerten Toxizität (Borkin *et al.*, 2015).

3.3.3 DOT1L-Inhibitoren

Die Histonmethyltransferase (HMT) DOT1L stellt ein weiteres wichtiges Target für pharmakologisch wirksame Moleküle dar. DOT1L methyliert Histon 3 an Lysin 79 (H3K79_{me}). In hämatologischen Malignitäten interagiert dieses Protein mit Komplexen, die mit MLL-Fusionspartnern (z.B. DotCom, siehe Abbildung 6) oder direkt mit den Fusionspartnern AF10, CALM, AF4, AF9, ENL und AF17 assoziiert sind, was eine Verbindung zwischen einer abnormalen H3K79-Signatur und der Leukämogenese herstellt (Bitoun *et al.*, 2007; Deshpande *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2005, 2006; Reisenauer *et al.*, 2009; Zeisig *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). In murinen und humanen ALL mit einer MLL-AF4-Leukämie konnte, im Gegensatz zu anderen ALL, ein erhöhtes H3K79-Level festgestellt werden. Eine shRNA-Inhibierung des *DOT1L* führte in diesem Zusammenhang zu einer Abnahme des Methylierungsprofils von MLL-AF4-Zielgenen, was die hohe Relevanz dieser epigenetischen Modifikation im Zusammenhang mit t(4;11)-Leukämien verdeutlicht (Krivtsov *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine hohe H3K79-Dimethylierung in Leukämien mit einer MLL-ENL oder MLL-AF9 mit der Expression der spezifischen Zielgene korreliert. Weiterhin bewirkte der Ausschluss des DOT1L-Bindemotivs im C-terminalen ENL-Teil den Verlust der Transformierbarkeit des MLL-ENL (Bernt *et al.*, 2011; Milne *et al.*, 2005c; Mueller *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2011). SAH (S-Adenosyl-L-homocystein), welches durch die Dimethylierung des SAM (S-Adenosyl-L-Methionin) entsteht, stellt einen kompetitiven Inhibitor des DOT1L dar. Jedoch wären durch die Nutzung des SAH als Therapeutikum weitere HMT von einer Inhibierung betroffen. Der Körper würde zudem ein Missverhältnis zwischen SAM und SAH ausgleichen (Anglin und Song, 2013). Der DOT1L-Inhibitor EPZ004777 inhibiert selektiv die SAM-Bindeaktivität des DOT1L, indem es in der Bindetasche des Methyl donors SAM bindet und dadurch die Aktivität der Histonmethyltransferase hemmt. Ein inhibitorischer Effekt auf andere humane HTM konnte *in vitro* ausgeschlossen werden. In einer Studie reagierten humane MLL-AF4 (MV4;11)- und MLL-AF9 (MOLM-13)-Zellen sensitiv auf EPZ004777 und wiesen unter der Behandlung eine verminderte Viabilität auf. Ebenso wurde die Expression der Gene *MEIS1* und *HOXA9* reprimiert und die H3K79-

Methylierung der Histone nahmen ab. Zellen ohne MLL-Translokationen blieben unaffektiert (Daigle *et al.*, 2011). Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte zudem einen zweiten DOT1L-Inhibitor (EPZ-5676), der selektiver und potenter ist und in Ratten und Mäusen zu einer Regression subkutaner MV4;11-Tumoren führte (Daigle *et al.*, 2013). Eine klinische Studie der Phase I an 42 Patienten (ALL, AML, MDS) wies durch eine EPZ5676-Gabe ebenfalls eine Reduktion ihrer H3K79me von etwa 30 % auf und führte zu drei Remissionen (zwei kompletten und einer partiellen) (Stein und Tallman, 2015). Durch die Beeinflussung mehrerer chromatinregulierender Prozesse konnte zudem ein Benefit bei der Therapie von MLL-r-Patienten entstehen, wie die Arbeiten von Chen *et al.* im Zusammenhang mit einem DOT1L-Inhibitor (EPZ004777) und einem SIRT1-Aktivator (SRT1720) zeigen (Chen *et al.*, 2015). Der DOT1L-Inhibitor SYC-522 selbst induzierte keine Apoptose in MLL-r-basierten AML-Zellen, führte jedoch zu einer Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit und zu einer höheren Sensitivität gegenüber gängigen Chemotherapeutika wie Etoposid, Mitoxantron und Cytarabin. Dieser Effekt war jedoch nur in Leukämiezellen mit MLL-Rearrangements zu finden (Liu *et al.*, 2014b).

Neueste Untersuchungen identifizierten eine typische Ausbreitung des gebundenen MLL-AF4 auf bis zu vier Kilobasen über den Promotor seiner Zielgene hinaus. Diese Ausbreitung, auch „*spreading MLL-AF4*“ genannt, korreliert mit der Bindung von MENIN1, uCPG, einer Reduktion der H3K36me3 und einer verstärkten H3K79me2. Zudem waren die *spreading*-Zielgene sensitiver auf eine Behandlung mit EPZ-5676 und ihre Expression verringerte sich um bis zu 50 %. Die Kombination des DOT1L-Inhibitors mit dem MENIN1-Inhibitor MI-503, bzw. dem BCL2-Inhibitor ABT-199, hatten einen synergistischen Effekt in der Regulierung der MLL-AF4-Zielgene (Kerry *et al.*, 2017).

Eine Reihe weiterer DOT1L-Inhibitoren mit unterschiedlich hohen Affinitäten zu DOT1L wurden entwickelt und auch z.T. bereits in *in vitro*-Versuchen getestet (Anglin *et al.*, 2012).

3.3.4 BET-Inhibitoren

Durch Translokationsereignisse verliert das MLL-Protein seine Bromodomäne, die zwischen der dritten und der vierten PHD-Domäne liegt. Jedoch ermöglicht die Rekrutierung der MLL-Fusionspartner (z.B. AF4) die Bindung des SEC, welches das BRD4 direkt rekrutiert und dem Komplex eine aktive Bromodomäne zur Verfügung stellt. BRD4 gehört zur Familie der BET (*Bromodomaine and Extra Terminal*)-Proteine und wird im Zusammenhang mit MLL-Fusionen als Ziel für Inhibitoren untersucht. Die Proteine

dieser Familie erkennen über ihre Bromodomäne Histonacetylierungen und agieren als Chromatin-Adapter-Proteine. Dadurch wird es z.B. dem MLL-AF4-Fusionsprotein ermöglicht, an Bereiche mit offenem Chromatin zu gelangen und über den SEC eine aberrante Transkriptionselongation voranzutreiben. Durch die Entwicklung spezifischer BET-Inhibitoren, wie dem I-BET151, konnte in t(4;11)-Zelllinien, bei Patientenmaterial und in Mausmodellen ein früher Zellzyklusarrest und eine Apoptose eingeleitet werden. Ebenso wurde die Expression von Schlüsselgenen, wie dem *BCL2*, *c-MYC* und *CDK6*, reprimiert (Dawson *et al.*, 2011). Über RNAi-Screens konnten Zuber *et al.* BRD4 als therapeutisches Ziel in AML identifizieren. Über shRNAs und den Inhibitor JQ1 konnten *in vitro* und *in vivo* antileukämische Effekte erzielt werden. So waren MLL-AF9- und MLL-ENL-Zellen sensitiv auf eine JQ1-Behandlung, was sich in einer verminderten Proliferation und einer geringeren Anzahl an Zellen in der S-Phase verdeutlichte. G1E- und MEF-Zellen blieben unaffektiert. In Mausmodellen konnte der shRNA-basierte *knockdown* des *Brd4* die Progression einer MLL-AF9-Leukämie verzögern und längere Überlebensraten hervorrufen. Die Gabe des BETi JQ1 konnte dieselben Effekte hervorrufen und verlängerte signifikant die Überlebenszeit nach der Transplantation (Zuber *et al.*, 2011).

Ein weiterer Aspekt ist die Interaktion des BRD4 mit dem PAFc und dem p-TEFb, was eine weitere Rekrutierung dieses Proteins an den MLL-FP-Komplex ermöglicht (siehe auch 1.4.1).

3.3.4.1 Fazit

Aggressive hämatopoietische Malignitäten, die mit aberranten Chromatinmodifikationen in Zusammenhang stehen, bergen neue Herausforderungen in der Behandlung. Chromatin *reader* wie BRD4, *eraser* wie HDAC oder *writer* wie DOT1L stellen wichtige Ziele für die Entwicklung neuer effektiver sowie hochspezifischer Inhibitoren in der Behandlung von MLL-assoziierten Leukämien dar. Generell ist die Entwicklung pharmakologisch relevanter Stoffe, die die epigenetischen Prozesse beeinflussen, immer mehr in den Fokus der heutigen Medikamentenentwicklung gerückt und werden in Zukunft den Markt um effektive und selektiv wirkende Arzneimittel erweitern. Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen deutlich den Benefit des HDACi TSA gegenüber den anderen hier beschriebenen Inhibitoren. Ein besonderer Vorteil stellt die Rekrutierung des endogenen MLL dar. Durch die anderen Inhibitoren, wie BETi, DOTi oder MENi, wird immer auch das wt-MLL beeinflusst und eine „Rehabilitierung“ der Zellen ist nicht möglich. Durch die Verwendung des HDACi TSA, der damit einhergehenden Rekrutierung des wt-MLL und der Normalisierung der aberranten *HOXA*-Expression auf ein physiologisches Level,

könnte die Zelle ihren malignen Charakter verlieren. Dies hätte gerade in Kombinationstherapien mit gängigen Chemotherapeutika den Vorteil, dass geringere Menge der üblichen Zytostatika ausreichen könnten, um einen Großteil der transformierten Zellen zu eliminieren. Durch das Umprogrammieren der Zellen durch HDACi könnte dann zusätzlich ein Rückfall durch nicht eliminierte Zellen verhindert werden. Die Behandlung wäre effektiver und die EFS womöglich länger. Der Nachteil, der sich daraus für die anderen beschriebenen Inhibitoren ergibt, ist die funktionelle Störung des endogenen MLL, was einen negativen Effekt hervorrufen könnte, wenn sowohl MLL-AF4 als auch das wt-MLL funktionsunfähig wären.

Ein weiterer Vorteil der HDACi ist, dass sie nicht, wie DOT1L und BRD4, abhängig vom rekrutierten Komplex funktionieren. Denn durch den dynamischen Prozess der Komplexrekrutierung haben nicht alle MLL-FP den gleichen Komplexpartner zur selben Zeit. Deshalb ist es effektiver, Inhibitoren gegen den N-terminalen MLL-Teil zu entwickeln, um alle MLL-FP sicher anzusprechen.

In der folgenden Abbildung sind die transkriptionsregulierenden Eigenschaften sowie die Angriffspunkte der beschriebenen Inhibitoren am Beispiel von MLL-AF4 zusammengefasst (siehe Abbildung 20).

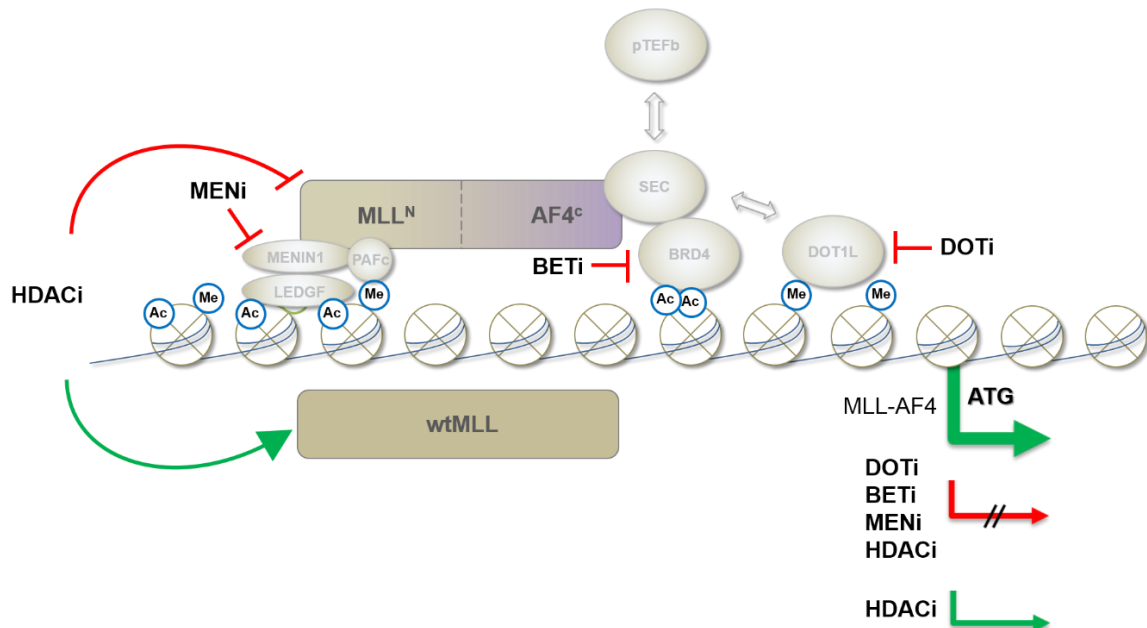


Abbildung 20: Regulierung der Transkription der MLL-FP-Zielgene durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren am Beispiel von MLL-AF4. MLL^N bindet über MENIN1 und LEDGF an seine Zielgene. Im Fall von MLL-AF4 können über den C-terminalen Teil z.B. der SEC oder der pTEFb-Komplex gebunden werden. Weitere Fusionspartner des MLL können aber auch DOT1L rekrutieren. Der MENIN1-Inhibitor (MENi) verhindert die Bindung des MLL an seine Zielgenpromotoren und deren Transkription wird reprimiert. BETi verhindert die Rekrutierung des BRD4-Komplexes und der DOT-Inhibitor die des DOT1L. Beide haben ebenfalls einen Verlust der Zielgenexpression zur Folge. HDAC-Inhibitoren führen in mäßigen Dosen zu einer Dissoziation des MLL-FP und zu einer Rekrutierung des wt-MLL, was zu einer „Normalisierung“ der Zielgenexpression führt. Hochdosiert wird ebenfalls die Transkription der Zielgene unterbunden.

3.4 IRX1 induziert direkt und indirekt die Expression der für das hämatopoietische System wichtigen Gene

Durch die DNA-Microarray-Analysen und die ChIP-Versuche wurden direkte und indirekte Zielgene des IRX1 identifiziert. Hier standen unter anderem die Proteine der EGR-Familie im Fokus. Die Gene dieser Familie werden in Anwesenheit des IRX1 indirekt überexprimiert und führen ebenfalls zu einer Reprimierung des *HOXA*-Clusters (siehe Abbildung 9 und Abbildung 17). Der EGR1-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor zum Beispiel moduliert als Stressantwort die Apoptose und das Zellwachstum. Neben weiteren Genen, die das Wachstum von Zellen regulieren, kontrolliert es direkt die Transkription des *p21*. In *in vitro*-Studien konnte eine Bindung des EGR1 über seine Konsensussequenz GCGGGGCG innerhalb der *p21*-Promotorregion nachgewiesen werden. Durch die EGR1-vermittelte Transkriptionsinduktion des *p21* wird ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase induziert und die Proliferation gehemmt (Liu *et al.*, 1996; Ragione *et al.*, 2003; Thiel und Cibelli, 2002). *EGR1*^{-/-}-Mäuse wiesen eine enorme Reduktion ihrer HSC-Proliferation im

Knochenmark auf und EGR1 wurde in diesem Zusammenhang als wichtiger Regulator der Quieszenz in hämatopoietischen Stammzellen identifiziert. Während der Mobilisierung der HSC ist *EGR1* reprimiert. In LT-HSC ist *EGR1* hingegen überexprimiert, was für eine Modulation des Selbsterneuerungsprozesses und der Lokalisation dieses Proteins in HSC spricht (Min *et al.*, 2008). Die Quieszenz von Stammzellen stellt jedoch Probleme bei Knochenmarktransplantationen oder Chemotherapien dar, da durch die fehlende Proliferation maligne HSC nicht eliminiert werden können. So zeigten *in vivo*-Versuche, dass *p21^{-/-}*-Mäuse im Gegensatz zu *p21^{+/+}*-Mäusen während einer wöchentlichen 5-Fluoruracil-Behandlung eine Überlebensrate von 10 % vs. 70 % der Kontrollgruppe nach einem Monat aufwiesen (Cheng *et al.*, 2000).

EGR1 führt zudem zu einer direkten Überexpression des *BMI-1* und einer direkten Inhibierung des *EZH2* (Spaapen *et al.*, 2013). Eine Überexpression des BMI-1 bewirkte eine Potenzierung der repressiven Aktivität des MLL-Komplexes *in vitro* und blockierte die Expression des humanen p14^{ARF} und p16^{INK4A} bzw. generell den *Ink4a/Arf*-Locus (Fan *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2003). Die beiden letzten Proteine sind in die Zellzyklusregulierung involviert und induzieren einen Zellzyklusarrest. Beide befinden sich auf demselben Genlocus, jedoch entsteht *ARF* durch einen alternativen Splicingprozess des Exon2 von *INK4A* (Quelle *et al.*, 1995; Sherr, 2001). Die Repression des *Ink4a/Arf*-Locus inhibiert die Fähigkeit zweier Tumorsuppressorgene, das Fortschreiten des Zellzyklus zu behindern. So wird durch die Expression des BMI-1 die Stammzelleigenschaft einer Zelle aufrechterhalten (Molofsky *et al.*, 2003, 2005). Des Weiteren vermittelt das ARF (murin: p19^{ARF}, human: p14^{ARF}) die Repression des MDM2, welches wiederum durch Ubiquitinylierung des p53 dessen Transport ins Zytoplasma und somit dessen Degradation induziert. Durch die Repression kommt es zu einer Akkumulation des p53, was unter anderem wieder zu einer Aktivierung des *p21* führt und die Quieszenz der HSC fördert. *P53* ist in 50 % aller menschlichen Krebsformen mutiert und akkumuliert aufgrund von Stresssignalen wie Hypoxie oder DNA-Schäden (Sherr, 2001). Durch die Anhäufung des p53 wird eine stringente und effiziente Kaskade an Apoptose- und Reparaturmechanismen eingeleitet. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass vor allem t(4;11)-Leukämien kaum Sekundärmutationen aufweisen (Andersson *et al.*, 2015; Bardini *et al.*, 2010; Prella *et al.*, 2013).

Die INK4a-Proteine inhibieren Cyclin-D-abhängige Kinasen, wie z.B. CDK4, durch Inhibierung des *CCND1*. Dadurch wird die Phosphorylierung des RB (*retinoblastoma protein*) verhindert. RB bleibt somit weiterhin an E2F gebunden und verhindert dessen Dissoziation, welche in einer Transition der Zellen in die S-Phase resultieren würde. Somit verbleiben die Zellen durch die INK4A-Proteinexpression in der G1-Phase (Baker und

McKinnon, 2004; Sherr, 2001). Als Konsequenz führt eine Kaskade an regulatorischen Prozessen durch die BMI-1-Inhibierung zu einer Verlagerung des Zellzyklus von der S-Phase in Richtung Quieszenz, was es Tumorzellen ermöglicht, in Nischen selbst Chemotherapien zu überleben und ein rasches Rezidiv, und somit eine *high-risk*-Erkrankung, auszulösen.

Die Expression des *EGR1* wird in HSC und LSC (*leucemic stem cell*) direkt durch CDK6 reprimiert. MLL-AF9 bindet direkt an den Promotorlocus des CDK6 und fördert dessen Expression. Die EGR1-CDK6-Achse kontrolliert den Übergang einer quieszenten Zelle in die G1-Phase. Unter normalen Bedingungen hat die Expression des CDK6 in HSC keine Auswirkung auf die Hämatopoese. Durch Stressstimuli (z.B. durch eine 5-FU-Behandlung) wiesen *CDK6^{-/-}*-HSC eine vermehrte Anzahl quieszenter Stammzellen auf. Die Anwesenheit des CDK6 bewirkte in diesen stimulierten Zellen jedoch einen Austritt der dormierenden Zellen aus der G0- in die G1-Phase. In leukämischen Stammzellen (LSC) zeigte sich das gleiche Bild, was CDK6 zu einem wichtigen Regulator des Zellzyklus macht und für die Aufrechterhaltung der Leukämie in *CDK6^{+/-}*-Zellen von Bedeutung ist. *In vivo*-Versuche bestätigten, dass ein *knockdown* des CDK6 in MLL-AF9-induzierten AML zu einem signifikanten Überlebensvorteil führt (55 Tage vs. 28 Tage der Kontrollgruppe). Zudem ist CDK6 in AML-Zellen für einen Block der myeloischen Differenzierung verantwortlich (Guzman, 2015; Placke *et al.*, 2014; Scheicher *et al.*, 2015).

Neben der EGR-Familie reguliert IRX1 auch direkt die Expression des *HOXB4*. *HOX*-Gene übernehmen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Ausbildung des hämatopoietischen Systems. Wie bereits in 2.8 beschrieben, vermittelt HOXB4 eine gesteigerte Regenerationsrate und eine gesteigerte Expansion hämatopoietischer Stammzellen *ex* und *in vivo*. Die normale Differenzierung und die Transformierbarkeit der Zellen wird jedoch nicht beeinflusst (Antonchuk *et al.*, 2002; Sauvageau *et al.*, 1995). HOXB4 befähigt murine, primitive hämatopoietische Progenitorzellen des Knochenmarks zu einer Langzeit-Repopulation von Knochenmarkzellen und zu einer Umwandlung in Zellen mit einem HSC-Phänotyp. Irradierte Mäuse konnten zudem durch die Transplantation dieser Zellen eine multilineale Hämatopoese aufbauen (Kyba *et al.*, 2002). Zur Entschlüsselung der genauen Prozesse, die HOXB4 induzieren, wurden genomweite Expressionsanalysen durchgeführt. Die meisten HSC-typischen Gene waren direkte Zielgene des HOXB4, jedoch wurden auch weitere interessante Gene durch HOXB4 dereguliert, wie z.B. *RUNX1*, *TGFB1*, *GATA2*. Neben hämatopoietischen Prozessen wurden auch Gene der Zellteilung, des Zellzyklus und der Chromosomenorganisation und Biogenese beeinflusst (Oshima *et al.*, 2011). In dieser Doktorarbeit

wurde ein Zusammenhang zwischen IRX1 und HOXB4 hergestellt, da durch ChIP-Analysen und RT-PCR-Experimente eine Bindung des IRX1 an der Promotorregion des *HOXB4* detektiert wurde. Dies resultierte in einer Überexpression dieses Gens (Abbildung 18, Abbildung 19). Zudem wurden die HOXB4-Zielgene *NOV*, *ERG* und *TGFB1* in den IRX1-transfizierten Zellen exprimiert, was für eine funktionelle Überexpression des *HOXB4* spricht. *NOV* war das am stärksten überexprimierte Gen in den HOXB4-Analysen von Oshima *et al.* und *TGFB1* wurde bereits in den hier vorgestellten DNA-Microarray-Daten in Anwesenheit des IRX1 stark exprimiert (siehe Abbildung 18, Abbildung 9: 8-fache Überexpression, p-Wert: 0,00002). Der durch HOXB4 induzierte Mechanismus ist notwendig für die Induktion und die Aufrechterhaltung leukämischer Stammzellen, was im Fall einer IRX1-charakterisierten t(4;11) ein Indiz für die Aggressivität und die hohe Rezidivrate dieses Leukämietyps sein könnte. Dies untermauern auch Studien von Bueno *et al.*, der die Expression der HOX-Cluster in humane ESC mit und ohne MLL-AF4 analysierte. Das Level des *HOXB4* war in der MLL-AF4-Kohorte sogar noch höher als das der *HOXA9* und *MEIS1*, welche als typischer Marker und Induktoren der MLL-assoziierten Leukämien gelten (Bueno *et al.*, 2012).

Dass IRX1 nicht nur als Aktivator, sondern auch als Repressor fungiert, zeigt die Transkriptionsrepression der *HOXA*-Gene und des *MEIS1*. Funktionell unterbindet IRX1 aber auch die Fähigkeit des MLL-AF4, seine Zielgene zu aktivieren, was in MLL-r-Leukämien ohne IRX1 zu einem Differenzierungs- und Apoptoseblock und einer gesteigerten Proliferation führt.

Das folgende Schaubild fasst die Erkenntnisse dieser Arbeit sowie relevante Ergebnisse aus der Literatur, die den Zusammenhang einer *IRX1*-Überexpression und einer t(4;11)-basierten Leukämie ergänzen, zusammen.

Untergruppe mit einem differenzierten Krankheitsmechanismus zu definieren. IRX1 steht hierbei im Mittelpunkt der Klassifizierung, da es für die Deregulierung der gängigen Leukämiemarker verantwortlich ist und zudem die Expression von Genen induziert, die die Aufrechterhaltung und die Expansion von Stammzellen und den Staus der Quieszenz fördern. Alle diese Faktoren könnten die besondere Aggressivität, die hohe Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und die schlechte Therapierbarkeit der HOXA^{low}-, IRX1^{high}-t(4;11)-Leukämiepatienten erklären.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Substanzen	Hersteller
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Analysenwaage TE124S-OCE	Sartorius
Blotting-Apparatur Trans-Blot® Turbo	Bio-Rad
Brutschränke	Heraeus
CO ₂ -Inkubator HERAccl 240	Thermo Scientific
Durchlichtmikroskop	Nikon
Eismaschine	Ziegra
FACSVerse™	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss
Fluorometer Qubit® 2.0	Life Technologies
Geldokumentation c200	Azure Biosystems
Gelkammer Easycast® B2 Owl	Thermo Scientific
Heizblock	VWR
Magnetisches Separations-Rack	New England Biolabs (#S1509S) Dyna (MPC-S)
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Molecular Imager Chemi DOC™ XRS+	Bio-Rad
Nanophotometer P330	Implen
Nucleofector™ 2b	Lonza
PCR-Gerät	Applied Biosystems
pH-Meter Level1	Inolab
Pipettierhelfer accu-jet®	Brand
Rollmischer SRT6D	Stuart
Rotator SB3	Stuart
Schüttelinkubator CH4103	Infors
StepOnePlus™ Real-Time PCR	Applied Biosystems
SterilGard Hood	The Baker Company, inc.
Tape Station 2200	Agilent Technologies
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallgerät Bioruptor™ Next Gen	Diagenode
UV-Tisch	Fröbel Laborgeräte
Vakuumpumpe VAC-MAN®	Promega
VarioSkan (Flash Multimode Reader)	Thermo Scientific
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Wasserbad Zellkultur SE-20C	Julabo

Wipptisch
Zellzähler TC10™
Zentrifugen

Heidolph
Bio-Rad
Eppendorf (5415D, 5424)
Beckman (J2-HS, J6-HC)
VWR (Galaxy Mini Star)

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Substanzen	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Roth
ε-Aminocapronsäure	Sigma Aldrich
Aceton	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	Bernd Euler Biotech.
Agarose	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Bacto Trypton	Oxoid
Bisacrylamid	Roth
Blasticidin S	AppliChem
Brilliantblau R-250	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA Fraktion V	Roth
BSA	New England Biolabs
CaCl ₂	Merck
CAPS	Roth
Chloramphenicol	Roth
Desoxycholsäure	Fluka
DMSO	Sigma Aldrich
λ-DNA	MBI Fermentas
dNTP	Roche
Doxycyclin	Sigma Aldrich
DTT	Invitrogen
EDTA	Roth
Essigsäure	Riedel-de-Haen
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
HEPES	Roth
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems
Hygromycin B	Roche
IPTG	Fermentas
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Lipofektamin 2000	Invitrogen
Lysozym	Sigma Aldrich

Methanol	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Merck
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Merck
NaCl	Roth
NaF	Riedel-de-Häen
NaHCO ₃	Merck
NaOH	Roth
Na ₃ VO ₄	Sigma Aldrich
Nonidet P-40	AppliChem
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma Aldrich
Ponceau S (ATX)	Fluka
Puromycin	PAA
Propidiumiodid	Roth
RNase A	Macherey-Nagel
RNase-Free-Water	Qiagen
Roti [®] -Load 1	Roth
Saccharose	Roth
SDS	Biomol
TEMED	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween [®] 20	Sigma Aldrich
X-Gal	Roth
Xylen-Cyanol-FF	Merck
Yeast Extract	Oxoid

4.1.3 Sonstige Materialien

Tabelle 3: Sonstige Materialien und deren Hersteller.

Sonstige Materialien	Hersteller
λ-DNA (für λ-Marker mit <i>Cla</i> I geschnitten)	Thermo Scientific
100 bp-Marker	New England Biolabs
1 kb-Marker	New England Biolabs
50 bp-Marker	New England Biolabs
3MM Chromatographiepapier	Whatman
Adhäsive Verschlussfolie für Realtime	Nerbe Plus
Amaxa [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit T	Lonza
Amaxa [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit R	Lonza
Amersham [™] Hybond [™] P0,45 PVDF	GE Healthcare
Big Dye [™] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Cell Counting Kit-8	Dojindo
Clarity [™] ECL Western Substrate	Bio-Rad
Color Protein Standard Broad Range	New England Biolabs
Cryo.S-Gefäße	Greiner bio-one

D1000 Screen Tape	Agilent Technologies
Gel Extraction Kit	Qiagen
Magnetische Beads Protein A	Cell Signaling
Magnetische Beads Protein G	New England Biolabs
Mehrzweckgefäß (50 ml; 15 ml)	Greiner bio-one, Corning
Mikrozentrifugengefäße (5 ml; 1,5 ml)	Eppendorf
	Greiner bio-one
Nitril Handschuhe S	VWR
ORA [®] qPCR Green ROX H Mix	HighQu
Parafilm "M"	Pechiney
PCR-Gefäße	Greiner bio-one
PCR-Platte (96 x 0,1 ml)	Nerbe Plus
PCR-Purification Kit	Qiagen
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pipetten (SL20, SL200, SL2000)	Rainin
(2,5)	Eppendorf
Power SYBR [®] Green Master Mix	Applied Biosystems
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
Qubit [®] dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Sequenziergefäße	Applied Biosystems
Sterile Pipetten (versch.)	Greiner bio-one
Sterile Pipettenspitzen (versch.)	Thermo Scientific, Sarstedt,
	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen Cellstar (versch.)	Greiner bio-one
Zellkulturschalen (versch.)	Sarstedt, Greiner bio-one
6-well Platte	Corning
12-well Platte	Greiner bio-one
96-well Platte	Greiner bio-one

4.1.4 Medien, Zusätze und Reagenzien

4.1.4.1 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 4: Verwendete Medien und Zusatzstoffe für die Zellkultur und deren Hersteller.

Nährmedien und Zusatzstoffe	Hersteller
Accutase	PAA*/Capricorn
DMEM High Glucose/Low Glucose/High Modified	PAA*
FBS	PAA*
L-Glutamin (200 mM)	GE Healthcare/Merck (Biochrom)
Opti-MEM	Gibco
PBS	PAA*/Gibco
PEI 10 mM (Polyethylenimin)	PAA*
Penicillin/ Streptomycin	PAA*/Gibco/Merck

RPMI 1640	PAA*/Gibco
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Gibco
Trypsin	PAA*
* PAA gehört mittlerweile zu GE Healthcare	

4.1.4.2 Nährmedien für *E. coli*

Tabelle 5: Verwendete Nährmedien für *E. coli* und deren Zusammensetzung. Alle Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Medien	Zusammensetzung
YT-Agar	1 % (w/v) Bacto Agar 0,5 % (v/v) NaCl 0,5 % (v/v) Yeast Extract
YT-Medium	1,2 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (v/v) NaCl 0,5 % (w/v) Yeast Extract
YT/amp-Medium	1 % (w/v) Bacto Trypton + 100 µg/ml Ampicillin

4.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I (pH 10,4)	300 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II (pH 10,4)	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Coomassie-Blau	0,016 % (w/v) Brillantblau R-250 20 % (v/v) Isopropanol 8 % (v/v) Essigsäure 50 % (w/v) Saccharose 100 mM EDTA 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylen-Cynol-FF
Elutionspuffer (ChIP)	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃
FA-Lysispuffer (ChIP)	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5)

	140 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 8) 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) Desoxycholsäure 1 % (w/v) SDS Frisch hinzufügen: 1x Proteaseninhibitor
Finaler Waschpuffer (ChIP)	0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM EDTA (pH 8) 250 mM NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 8)
Kathodenpuffer (pH 9,4)	25 mM Tris 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure 20 % (v/v) Methanol
Lämmli-Puffer (2x)	20 mM Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Low-TE	10 mM Tris/HCl (pH 8) 0,1 mM EDTA
Lysispuffer (pH 7,5)	150 mM NaCl 20 mM HEPES 0,4 mM EDTA 2 % (v/v) Triton X-100 Frisch hinzufügen: 1 mM Na_3VO_4 10 mM NaF 1 mM PMSF 1x Proteaseninhibitor
Matsudaira Puffer (pH 11/NaOH) (Wet Blot MLL-AF4)	10 mM CAPS 15 % (v/v) Methanol
Puffer 1 (Mini-Präp.)	50 mM Tris/HCl (pH 8) 10 mM EDTA
Puffer 2 (Mini-Präp.)	1 % (w/v) SDS 0,2 M NaOH
Puffer 3 (Mini-Präp.)	3 M Kaliumacetat (pH 4,8)

RIPA (-SDS) (ChIP)	50 mM Tris/HCl (pH 8) 150 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8) 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) Desoxycholsäure
RLN-Puffer (pH 8)	50 mM TrisHCl 140 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 % (v/v) NP-40
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1 M Tris
SDS-Laufpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1 g SDS ad. 1 l MQ
Staining Puffer (Zellzyklus)	0,2 mg Propidiumiodid (1mg/ml) 2 mg RNase A (100mg/ml) 10 ml PBS
Stripping-Puffer (mild) (pH 2,2/HCl)	15 g Glycin 1g SDS 10 ml Tween [®] 20 ad. 1l
Stripping-Puffer	100 mM NaOH 2 % (v/v) SDS 0,5 % (w/v) DTT
TBE-Puffer	100 mM Tris 500 mM H ₃ BO ₃ 2,5 mM EDTA
TBS-T	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,2 % (v/v) Tween [®] 20
Trenngelpuffer (pH 8)	1 M Tris
Waschpuffer (ChIP)	0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM EDTA (pH 8) 150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 8)

4.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und mit einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt. Die Arbeitslösung betrug zwischen 2-5 pmol/μl.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide, sortiert nach Verwendung. Neben der Bezeichnung ist auch die Nukleotidabfolge in 5'→3' Richtung aufgelistet. Die mit fw/F gekennzeichneten Oligonukleotide beschreiben die in 3'-Richtung gerichtete, die mit rev/R gekennzeichneten die in 5'-Richtung orientierten Oligonukleotide.

Name	5' → 3'
Für RT-PCR	
BCL2_fw	GACTGAGTACCTGAACCGGC
BCL2_rev	GGGCCAAACTGAGCAGAGTC
EGR1_fw	AGCCCTACGAGCACCTGA
EGR1_rev	CTGACCAAGCTGAAGAGGGG
EGR2_fw	GGTTTTGTGCACCAGCTGTC
EGR2_rev	TGGGAGATCCAACGACCTCT
EGR3_fw_1	ACAATCTGTACCCCGAGGAGA
EGR3_rev_1	TCCAAGTAGGTCACGGTCT
EGR3_fw_2	CAGCGACTCGGTAGTCCATT
EGR3_rev_2	TAGGTCACGGTCTTGTTGCC
ERG_fw	CAGCAGGATTGGCTGTCTCA
ERG_fw/2	GACGACTTCCAGAGGCTCAC
ERG_rev	CCTCCATGTAGCTGCCGTAG
ERG_rev/2	GCATGCATTAACCGTGGAGAG
GAPDH_fw	GGTCACCAGGGCTGCTTTTA
GAPDH_rev	CGTTCTCAGCCTTGACGGTG
HOXA10_fw	CTTCCGAGAGCAGCAAAGCC
HOXA10_rev	ACTCCTTCTCCAGCTCCAGT
HOXA13_fw	TGCCCAACGGCTGGAA
HOXA13_rev	TAAGGCACGCGCTTCTTTCT
HOXA3_fw	AATGCCAGCAACAACCCTAC
HOXA3_rev	TGCTGGTTTTCTGCTTTGTG
HOXA4_fw	AAGACCACAACTGCCCAAC
HOXA4_rev	GGTGTGGGCTCTGAGTTTGT
HOXA5_fw	ATTGTAGCCGTAGCCGTACC
HOXA5_rev	CCGGACTACCAGTTGCATAAT
HOXA6_fw	GCTGTCCGGTTTGTACTGCT
HOXA6_rev	AGTCTCCCGGACAAGACGTA
HOXA7_fw	TGAGGCCAATTTCCGCATCT
HOXA7_rev	CGTCAGGTAGCGGTTGAAGT
HOXA9_fw	AGTTGGCTGCTGGGTTATTG
HOXA9_rev	CCACGCTTGACACTCACACT
HOXB4_fw	CCCTGGATGCGCAAAGTT
HOXB4_rev	AATTCCTTCTCCAGCTCCAAGA

IRX1_fw	GGATCTCAGCCTCTTCTCG
IRX1_rev	GTGGAGACCTGCGTGAGG
IRX2_fw	GGCTTCCCGTCCTACATG
IRX2_rev	CCACGTGCAGGCTGATCC
IRX3_fw	CTGTCCAACGTGCTCTCGTC
IRX3_rev	GGGCTGTCCTTCAGCTCATA
LEDGF_fw	AGGGGTTACTTCAACCTCCGA
LEDGF_rev	GCGTTTTTCGATCTGCTGCTT
MEIS1_fw	TCTGCCACCGGTATATTAGCTG
MEIS1_rev	AACGAGTAGATGCCGTGTCA
MENIN1_fw	ATGCCTGGGTAGTGTGGG
MENIN1_rev	CATGAACGCCACCTCCATCT
NOV_fw	TGCTACTGCCTGAGCCTAAC
NOV_rev	GTCCACTCTGTGGTCTGTTCA
RPL13A_fw	TGGTGCTTGATGGTTCGAG
RPL13A_rev	TGTTGATGCCTTCACAGCGTA
TGFB1_fw	GTACCTGAACCCGTGTTGCT
TGFB1_rev	GTTGCTGAGGTATCGCCAGG

Für Sequenzierungen

8*3	CCCAAACCCTCCTAGTGAG
AF4*5	TTCCTGTCCTGCTCCTCACTGTC
F1-MLL-Prom-seq1	GTAAACTGGGCAGCGCTTCT
F2.1-MLL-Prom-seq1	CCAGTGGAGGGACGTAGGTT
F3-MLL-Prom-seq1	TCCTGACCTCATGATCCGCC
F3-MLL-Prom-seq2	CAGAGGCTTGAGTCTGGGGA
MLL-P-F1-seq1	GAAAGGCCCTCAATGAACGC
MLL-P-F1-seq2	CCCTCCTTTTTCCCGAGCAAT
MLL-P-F3seq3	TGAGCCTAAGTGCTTTATGTGC
pGEMT-SP6	TAAGATATCACAGTGGATTTA
pGEMT-T7	ATTATGCTGAGTGATATCCC
SV40pA.Avi.R	GGTACCTACCACATTTGTAGAGTT
TCE-SF	CCTGGAGCCAATTCCAACCTCT
TCZP-IRX3-seq1	CTGGGCGCGCAGTATGAG
TRE2.SF	TTGACTTCCATAGAAGACAC

Für die Konstruktion der pSBtet-Vektoren/piTR-Vektoren

EGR1.sfi.F	GGCCTCTGAGGCCACCATGGCTGCGGCCAAGGCCGA
EGR1.sfi.FI.R	GGCCTGACAGGCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTGTAG TCGCAAATTTCAATTGTCCTGGGAGAAAAGGTTGCTGT CAT
EGR2.sfi.F	GGCCTCTGAGGCCACCATGATGACCGCCAAGGCCGTA GACAAAATCCCAGTA
EGR2.sfi.FI.R	GGCCTGACAGGCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTGTAG TCAGGTGTCCGGGTCCGAGAGGAGCA
EGR3.sfi.F	GGCCTCTGAGGCCACCATGACCGGCAAACCTCGCCGAG AAGCTGCCGGT
EGR3.sfi.FI.R	GGCCTGACAGGCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTGTAG TCGGCGCAGGTGGTGACCACGGGGGCCA

IRX2.bsmb.F	CGTCTCAACTCATGTCCTACCCGCAGGGCTACCTGTA
IRX2.Sfi.F	GGCCTCTGAGGCCACCATGTCCTACCCGCAGGGCTAC CTGTA
IRX2.Sfi.R	GGCCTGACAGGCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTGTA TCTAGGTAGGGCTGGACGCCCCCGCCAACCACGGTGC A
IRX3.bsmb.F	CGTCTCAACTCATGTCCTTCCCCAGCTGGGATACCAA
IRX3.Mut.F	CGGCCGCcGCGGCCGCGCCGCCCAAGGCTACGGCG CCTTCCT
IRX3.Mut.R	CGGCCGCgGCGGCCGCGGCGTAGGGCGCCCCGTACA CGGACGAGAGCACGTT
IRX3.Sfi.F	GGCCTCTGAGGCCACCATGTCCTTCCCCAGCTGGGA TACCAA
IRX3.Sfi.R	GGCCTGACAGGCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTGTA TCGGATGAGGAGAGAGCCGATAAGACCA

Für ChIP

hEGR1intr_fw	TGTTTTGATGAGCGGGGCT
hEGR1intr_rev	TCCACGGCCAAGGATCAC
hEGR1prom_fw	ATTAGGGCTTCCTGCTTCCC
hEGR1prom_rev	CCCGGATCCGCCTCTATTT
hEGR2intr_fw	CGACGCCGGTTTCCTTG
hEGR2intr_rev	CTCAGCCCAAGGCCAGT
hEGR2prom_fw	AACTCCTGGCTTCCCAGC
hEGR2prom_rev	AGTAGCAAACAAGTTGCTGTTTTT
hEGR3intr_fw	CTCTCCCGCCATGGAGAC
hEGR3intr_rev	AGCTTTAGGCTCTTGCTGGA
hEGR3prom_fw	ATCAATACTGAGGCCGCGT
hEGR3prom_rev	TCTGAGGCTGGGTCGTGG
hGAPDH_fw	CGTCCTTGACTCCCTAGTGTCTCTG
hGAPDH_rev	GAAGGGACTGAGATTGGCCCGATG
hHOXA10_fw	CGCAACCACCCAGCCAG
hHOXA10_rev	TTGTCCGCCGAGTCGTAGAGG
hHOXA9 downstr_fw	GGATATTCCACCAAAGCCCTTTCAT
hHOXA9 downstr_rev	GGCAATGCCAATAAAAGAGGTGTTT
hHOXA9_fw	ATGCTTGTGGTTCTCCTCCAGTTG
hHOXA9_rev	CCGCCGCTCTCATTCTCAGC
hHOXA9intr_fw	AGTGCGGCGTAAATCCT
hHOXA9intr_rev	TGATCACGTCTGTGGCTTATTTGAA
hHOXA9pr_fw	TGGCTGCTTTTTTATGGCTTCAATT
hHOXA9pr_rev	CCGCGTGCGAGTGC
hHOXB4 prom_fw	TTAAATATCCGGGGCCCCATC
hHOXB4 prom_rev	AAGTCCTTTTGGAAAATTTCAGTGG
hHOXB4intr_fw	AATCCGTATTTAAGCAGAGAGTTGA
hHOXB4intr_rev	TTTGCTCACTTCTCCAGCCAA
hMEIS1intr_fw	TCTCAGCGCCTCCAAATCTTG
hMEIS1intr_rev	TTTGTGTGTGTGAAATTTAGCTATTTAGGTTTT
hMEIS1prom_fw	CGGCGTTGATTCCCAATTTATTCA

hMEIS1prom_rev CACACAAACGCAGGCAGTAG
hMyoC_rev GAAGTGCGAGTGCTCTTCGG
hMyoC_fw CGGCTCTCTCTGCTCCTTTG

4.1.7 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme und deren Hersteller.

Enzyme	Hersteller
DNase	Qiagen
GoTaq® DNA Polymerase (+Puffer)	Promega
KAPA2G Robust PCR Kit	Peqlab
PCR-Extender System (+Puffer)	5Prime
Proteinase Inhibitor Cocktail (cOmplete Tablets)	Roche
Proteinase K (ChIP) (20 mg/ml)	Ambion/Amresco
Restriktionsendonukleasen (+Puffer)	New England Biolabs
RNase A	Sigma Aldrich
RNase A (ChIP) (30mg/ml)	Abcam
RNasin	Promega
Superscript Reverse Transcription Polymerase	Invitrogen
T4-DNA Ligase/Quick Ligase (+Puffer)	New England Biolabs

4.1.8 Antikörper

4.1.8.1 Primäre Antikörper

Alle Primärantikörper für Western Blot-Versuche wurden mit 5 % BSA in TBS-T angesetzt.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten primären Antikörper. Die Angaben der eingesetzten Mengen der jeweiligen Antikörper zur Immunpräzipitation beziehen sich auf einen einfachen Ansatz, wie er in 4.2.6 beschrieben ist.

Antikörper	WB/IP[μ l]	Beschreibung	Hersteller
anti-Acetyl-Lysin	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen posttranslationale Acetylierungen von Lysin-Resten	Cell Signaling (#9441)
anti-AKTIN	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane AKTIN-Protein	Sigma Aldrich (A2066)
anti-BMI1	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane BMI1-Protein	Abcam (ab38295)
anti-CDK9	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane CDK9-Protein	Santa Cruz (sc-484)
anti-CYP33	1:500/-	Polyklonaler-Maus Antikörper gegen das humane CYP33 (PPIE)-Protein	Abcam (ab168642)

anti-DOT1L (KMT4)	1:200/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane DOT1L-Protein	Abcam (ab64077)
anti-HDAC1	1:4000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane HDAC1-Protein	Abcam (ab19845)
anti-HOXA9	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane HOXA9-Protein	Abcam (ab83480)
anti-IRX1	1:500/5	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane IRX1-Protein	Abcam (ab72642)
anti-MENIN1	1:1000/4,5	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane MENIN1-Protein	Abcam (ab2605)
anti-MLL-C	-/6	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen den C-terminalen Bereich (AA 2829-2883) des humanen MLL-Proteins	Active Motif (61295, 61296)
anit-mCherry	1:1000/5	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das mCherry-Protein	Abcam (ab167453)
anti-PSIP1 (LEDGF/p75)	1:1000/-	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen das humane PSIP1-Protein	Abcam (ab49281)
anti-Goat IgG	-/-	Ziege IgG als Negativkontrolle in CHIP- und CoIP-Experimenten.	Santa Cruz (sc-2028)

4.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Alle Sekundärantikörper für Western Blot-Versuche wurden mit 5 % Milch in TBS-T angesetzt.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	WB	Beschreibung	Hersteller
anti-rabbit	1:10000	Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen Hase-IgG mit Meerrettich-peroxidaseaktivität.	Bio-Rad
anti-mouse	1:10000	Polyklonaler Hase-Antikörper gegen Maus-IgG mit Meerrettich-peroxidaseaktivität.	GE Healthcare (NIF825)
VeriBlot (HRP)	1:2000	Monoklonaler Antikörper, detektiert nur native Antikörper und minimiert dadurch die Detektion der schweren und der leichten Kette nach der Denaturierung bei IP-Versuchen. Gekoppelt an eine Meerrettich-peroxidase.	Abcam (131366)

4.1.9 Organismen

4.1.9.1 Zelllinien

Tabelle 11: Verwendete humane Zelllinien und deren Beschreibung. Die Kultivierung der aufgelisteten Zellen erfolgte bei 37°C; 5-7,5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen. Sie sind ein Derivat der Zelllinie 293 und tragen zusätzlich ein Plasmid mit einer Mutante des temperatursensitiven Gens des SV40 T-Antigens und einer Neomycinresistenz. Klassifiziert als Sicherheitsstufe S1. Fibroblastisches Zellwachstum, adhärenent als Monolayer.	ATCC® CRL-3216™ DSMZ ACC 635 (Graham <i>et al.</i> , 1977)
RS4;11	Humane B-Zell-Vorläuferzellen mit einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL L2) isoliert aus dem Knochenmark einer 32-jährigen Frau. Exprimieren das Fusionsgen MLL-AF4. Suspensionszelllinie klassifiziert als Sicherheitsstufe S1.	ATCC® CRL-1873™ DSMZ ACC508 (Stong <i>et al.</i> , 1985)
SEM	Humane B-Zell-Vorläuferzellen mit einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), isoliert aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens nach einem Rückfall (Relaps). Exprimieren das Fusionsgen MLL-AF4. Suspensionszelllinie klassifiziert als Sicherheitsstufe S1.	DSMZ ACC546 (Greil <i>et al.</i> , 1994; Reichel <i>et al.</i> , 1998b)

4.1.9.2 Bakterienstämme

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme für Transformationen und deren Genotyp.

Bakterienstamm (<i>E. coli</i>)	Genotyp
JM110	rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] hsdR17(rκ ⁻ mκ ⁺) (www.openwetware.org)
TOP10F' (Invitrogen)	F'[lacI ^q Tn10(tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻ (www.openwetware.org)

4.1.10 Vektoren und Plasmide

pITR-TCZP/pITR-TCZH/pITR-TCTP: Diese konstitutiven Expressionsplasmide der 1. Generation können über ihre *inverted tandem repeats* (ITRs) und einer zusätzlichen Transposase über konservative Transposition (*cut and paste*) in das Genom von HEK293T-/SEM-Zellen integriert werden. Die Insertion des GOI in den Vektor erfolgt über spezifische *SfiI*-Schnittstellen *in frame* hinter einen Doxycyclin-induzierbaren Promotor (TRE2, **T**). Zudem verfügt das Expressionsplasmid über eine strangabwärts gelegene polyA-Sequenz (SV40pA) und über einen CMV-Enhancer (**C**). Ein weiterer ORF dieses Plasmids, unter einem PGK-Promotor, besitzt das Gen eines Fluoreszenzproteins (zsGreen: **Z**; dTomato: **T**), des reversen Transaktivators rtTA2^s-M2 und der Puromycin-N-acetyl-transferase (P) bzw. Hygromycin-B Kinase (H). Alle Proteine dieses konstitutiven Lese-rahmens werden posttranslational proteolytisch voneinander getrennt, da sie durch ein 2A-Peptid verbunden sind.

pSBtet-G-P/pSBtet-B-B/pSBtet-R-B Diese konstitutiven Expressionsplasmide der 2. Generation weisen so gut wie keine Basaltranskription des induzierbaren GOIs ohne Promotorinduktion auf. Auch hier kann über die vorhandenen *inverted tandem repeats* (ITRs) und einer Transposase eine konservative Transposition (*cut and paste*) in das Genom von HEK293T-/SEM-Zellen erfolgen. Die Insertion des GOI in den Vektor erfolgt über spezifische *SfiI*-Schnittstellen *in frame* hinter einen Doxycyclin-induzierbaren Promotor (TCE). Zudem wird dem GOI eine synthetische polyA-Sequenz (synPA/SV40pA) angefügt. Ein weiterer ORF dieses Plasmids, unter dem konstitutiven RPBSA-Promotor, beinhaltet das Gen eines Fluoreszenzmarkers (**GFP**, **BFP**, **RFP**), des reversen Transaktivators rtTA2^s-M2 und das eines Selektionsmarkers (Puromycin-N-acetyl-transferase (P), Blastocidin-S-Deaminase (B)). Alle Proteine des konstitutiven Leserahmens werden posttranslational proteolytisch voneinander getrennt, da sie durch ein 2A-Peptid getrennt sind. Diesem zweiten ORF ist ebenfalls eine synthetische polyA-Sequenz, ein *bovine growth hormone*-polyA (bGH-pA), angefügt.

Als GOIs standen folgende Varianten zur Verfügung: *IRX1*, *IRX2_cFLAG* (mit 3'-terminalem FLAG-Anhang), *IRX3_cFLAG* (mit 3'-terminalem FLAG-Anhang), *EGR1_cFLAG* (mit 3'-terminalem FLAG-Anhang), *EGR2_cFLAG* (mit 3'-terminalem FLAG-Anhang), *EGR3_cFLAG* (mit 3'-terminalem FLAG-Anhang), *MLL-AF4*, *MLL-AF4ST* (mit 3'-terminalem STREP-Anhang), *MLL-AF4mCH* (mit 3'-terminalen *mCherry*) und *luc2* (Luciferasegen von *Photinus pyralis* als Leervektor). Alle Proteinanhänge wurden direkt (*in frame*) an die Aminosäuresequenz des GOIs angefügt und das jeweilige Stopp-Codon an das 3'-Ende verlegt. Als Matrize der GOIs von *IRX1-3* und *EGR1-3* dienten käuflich

erworbene cDNA-Klone der Firma Source BioScience, denen zur Verwendung in den oben beschriebenen Vektoren spezifische *Sfi*I-Schnittstellen und Anhänge angefügt wurden, bevor, nach vorherigen Kontrollsequenzierungen, die GOIs in die pITR/pSBtet-Vektoren kloniert wurden.

pGEM-T[®] Vektor (Promega): Dieser pGEM[®]-5Zf(+) Vektor von Promega ist bereits mit *Eco*RV geschnitten und mit 3'-terminalen Thymidinen an den Enden der Schnittstellen ausgestattet. Dadurch wird eine Religation verhindert und eine bessere Insertion ermöglicht. In diesem Fall wurden die GOIs mit dem PCR-Extender System von 5Prime amplifiziert, welches Adenosin-Überhänge an beiden Seiten generierte.

pcGlobin SB100_{xco}: Dieser Vektor war eine freundliche Spende von Dr. Zoltán Ivics, Paul-Ehrlich-Institut Langen. Er kodiert für die hyperaktive Transposase, welche essentiell für die konservative Transposition der pITR- und pSBtet-Vektoren ist.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Standardmethoden

Die unten aufgelisteten Standardmethoden wurden wie in der Protokollsammlung „*Molecular Cloning A Laboratory Manual*“ (Sambrook und Russell, 2001) aufgeführt durchgeführt. Falls Herstellerangaben zur Durchführung einer Methode vorhanden waren, wurden diese zur Durchführung herangezogen.

Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA/cDNA/RNA

Blau-Weiß-Selektion mit pGEM-T[®] (Promega)

CCK-8 Assay (Dojindo)

Elektroporation von *E. coli*-Bakterien (Qiagen)

Extraktion von Gesamt-gDNA aus Säugerzellen

Fällung von Nukleinsäuren (alkoholische Fällung)

Gelextraktion von DNA (*QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen)

Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten *E. coli*-Bakterien

Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden

Isolierung von zytoplasmatischer RNA aus Säugerzellen (*RNeasy Mini-Kit* von Qiagen)

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (*PureYield[™] Plasmid MidiPrep System* von Promega)

Ligation von DNA mittels T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)

Minilysat Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* mittels alkalischer Lyse
PCR-Analysen
Phosphorylierung von 5'-Enden der DNA mittels T4-Polynukleotidkinase
Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA
Photometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinen (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen
Reverse Transkription von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase (Invitrogen)
Spaltung von DNA mit diversen Restriktionsenzymen (New England Biolabs®)
Transformation von CaCl₂-kompetenten *E.coli*-Bakterien mittels Hitzeschock
Western Blot (*Semi-dry:Trans-Blot® TURBO™* von Bio-Rad oder *Wet-blot* für MLL-AF4mCH)

4.2.2 RT-PCR (*Real Time-PCR*)

Für die RT-PCR wurde das *StepOne Plus*-System von Applied Biosystems genutzt. Mit Hilfe des interkalierenden *SYBR Green I* (*Power® SYBR Green*, Applied Biosystems oder *ORA™ RT-PCR Green ROX H MIX* von highQu) erfolgte die Quantifizierung der Amplifikate nach jedem Zyklus in Echtzeit. Mit steigender Amplifikatmenge steigt auch die Intensität der gemessenen Fluoreszenz. Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Normiert wurden die Messungen auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz dienten Zellen, die mit dem jeweiligen Leervektor transfiziert wurden. Für die PCR-Reaktion wurde pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ein Ansatz mit einem Volumen von 25 μ l pipettiert. Der Ansatz umfasste den 1x SYBR Green I-Mix mit 0,25 μ l (ca. 7,5 ng/ μ l) der umgeschriebenen cDNA als Template und jeweils 5 pmol des vorwärts- und rückwärtsgerichteten Oligonukleotids und wurde mit autoklaviertem MQ-Wasser aufgefüllt. Der PCR-Zyklus bestand aus einer 10-minütigen initialen Denaturierung, gefolgt von 40 Zyklen mit je 15 sec Laufzeit bei 95°C und 1 min Elongation bei 60°C. Im Anschluss folgte ein Zyklus mit denselben Einstellungen und einer abschließenden 15-sekündigen Denaturierung bei 95°C, um die Schmelzkurven der Transkripte zu bestimmen.

4.2.3 Sequenzierung

Der *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* sequenziert nach der Kettenabbruch-methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Durch die Benutzung vier verschiedener Fluoreszenzsignale kann die exakte Nukleotidabfolge ermittelt werden. Zur Probenvorbereitung muss das Transkript (1 µg) mit 1x *ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Solution* und 2 pmol eines Oligonukleotids auf 10 µl MQ-Wasser aufgefüllt und im *PCR-Cycler* 35 Zyklen amplifiziert werden. Folgendes Programm wurde hierbei verwendet: Initiale Denaturierung für 10 sec bei 96°C, Annealing für 10 sec Laufzeit bei 56°C und Elongation für 4 min bei 60°C. Die DNA wurde anschließend durch ein Ethanol/ 3 M Natriumacetat-Gemisch gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 15 µl *Hi-Di™* gelöst und sequenziert.

4.2.4 Proteinextraktion

Die Gesamtzellproteine der Säugerzellen wurden extrahiert, indem die Zellen in einem geeignetem Volumen Lysispuffer aufgenommen und für 45 min bei 4°C rotiert wurden. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C wurde der proteinhaltige Überschuss in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1x *Lämmli-Puffer* oder 1x *Roti®-Load 1* für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* photometrisch bestimmt.

4.2.5 Western Blot und Membran-Stripping

Um Proteinlysate ihrer Masse nach aufzutrennen, wurden diese über ein 6-12 %-iges SDS-Gel für 1,5 h bei 100 V aufgetrennt. Die Übertragung auf PVDF-Membranen erfolgte bei großen Proteinen wie dem MLL-AF4mCH über einen Wet-blot für 16 h bei 30 Volt und 4°C in Matsudaira Puffer. Alle anderen Proteine wurden im Semi-dry Verfahren mit Hilfe des *Trans-Blot® TURBO™* von Bio-Rad im Standardprogramm übertragen. Erfolgreiches Blotting wurde bei Bedarf mit einer Ponceau S-Färbung überprüft. Das Blocken der Membran und die Detektion der Proteine mit Hilfe von HRP-konjugierten Antikörpern erfolgte wie in Standardwerken und in 4.1.8 angegeben. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des *Molecular Imager Chemi DOC™ XRS+* von Bio-Rad.

Für das *Reprobing* von Membranen wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe verschiedener Stripping Puffer entfernt, sodass eine erneute Detektion mit verschiedenen

Antikörpern angeschlossen werden konnte. Der milde Stripping Puffer wurde 2 Mal für 10 min bei RT mit der Membran inkubiert und anschließend gründlich 4 Mal mit TBS-T gewaschen. Der normale Stripping Puffer inkubierte 1 h bei 55°C mit der Membran im Brutschrank. Auch hiernach folgte gründliches Waschen mit TBS-T.

4.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Diese Methode wurde verwendet, um herauszufinden, ob ausgewählte Proteine an bestimmte Chromatinbereiche binden. Dies ist vor allem bei der Untersuchung von Transkriptionsfaktoren von Interesse, da somit direkte und indirekte Zielgene ermittelt oder Unterschiede in der Zusammensetzung der gebundenen Transkriptionsmaschinerie festgestellt werden können.

Zellernte und Quervernetzung

Am ersten Tag wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen pro 15 cm Zellkulturschale ausgebracht. Diese wurden am Folgetag mit 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Je nach Bedarf wurden 16 h vor der Zellernte 300 nM TSA oder das gleiche Volumen DMSO hinzugefügt. Alle ChIP-Versuche in dieser Arbeit wurden mit HEK293T-Zellen durchgeführt, welche zunächst mit dem Medium abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Die Platte wurde mit 5 ml PBS nachgespült, um alle auf der Platte befindlichen Zellen abzulösen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1.400 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 5 ml DMEM ohne Phenolrot (*DMEM High Modified*) aufgenommen und die Proteine mit dem gebundenen Chromatin durch eine Doppelfixierung quervernetzt (*crosslink*). Doppelfixierungen sind vor allem bei Transkriptionsfaktoren sinnvoll, da diese nur kurz am Chromatin verweilen und keine starke Bindung eingehen.

Für die erste Fixierung wurde die Zellsuspension unter leichtem Vortexen tropfenweise mit 20 µl 0,5 M Di(N-succinimidyl) Glutarat versetzt und für 45 min bei RT inkubiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und für die zweite Fixierung in 10 ml PBS aufgenommen. Unter Vortexen wurden hierfür tropfenweise 270 µl 37 % Formaldehyd hinzu pipettiert und 10 min bei RT rotiert. Durch die Zugabe von 1,25 ml 1 M Glycin wurde die Reaktion abgestoppt.

Zellyse

Nach der Quervernetzung der Proteine an das gebundene Chromatin wurden die Zellen lysiert. Alle folgenden Arbeiten und Zentrifugationsschritte wurden auf Eis, mit gekühlten Lösungen bzw. bei 4°C durchgeführt.

Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1.400 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert und in je 1 ml FA-Lysispuffer resuspendiert. Dieser Ansatz inkubierte für 30 min auf Eis, wobei die Suspension alle 10 min durchmischt (vortexen) wurde.

Sonifizierung

Um eine optimale Lyse zu erreichen und das Chromatin in etwa 200-500 bp große Fragmente zu scheren, folgte die Sonifizierung mit dem *Bioruptor® Next Gen* (Diagenode). Die Geräteeinstellung wurde wie folgt vorgenommen: 10 Zyklen mit je 30 sec Sonifizierung und 30 sec Pause, auf der Stufe *high*. Das Wasserbad sollte eine Temperatur von 4°C haben. Die lysierten Proben wurden in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und mit den mitgelieferten Sonifizierungsstäben verschlossen. Die Lysate wurden sechsmal hintereinander sonifiziert, wobei nach jedem Durchgang das Wasserbad wieder auf 4°C abgekühlt wurde. Die Lysate wurden anschließend in je ein Aliquot à 100 µl (INPUT-Probe) und Aliquots à 200 µl (für Immunpräzipitation) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff vorgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Aufhebung der Quervernetzung und Kontrolle der eluierten DNA

Um die Größe der gescherten Chromatinfragmente zu bestimmen, wurde zunächst die Quervernetzung der INPUT-Probe aufgehoben und die DNA aufgereinigt. Hierzu wurden 50 µl der INPUT-Probe mit 100 µl Elutionspuffer versehen und zunächst mit 2 µl 0,5 mg/ml RNase A 5 min bei 37°C und 750 rpm geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 5 µl 20 mg/ml Proteinase K und eine 4-stündige Inkubation bei 65°C und 500 rpm auf dem Heizschüttler. Die anschließende DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem *ChIP DNA Clean & Concentrator™* von Zymo Research nach Herstellerangaben. Eluiert wurde die DNA in 30 µl *Elution Buffer* (Kit).

Mit Hilfe der *2200 Tape Station* von Agilent Technologies wurde 1 µl der eluierten DNA über Elektrophorese aufgetrennt. Etwa 70-80 % der DNA sollte eine Größe zwischen 200-500 bp haben.

Immunpräzipitation

Während der Immunpräzipitation und der *Bead*-Vorbereitung wurden ausschließlich *Low Binding*-Reaktionsgefäße verwendet. Je 10 µl der magnetischen Protein A- und Protein G-*Beads* wurden dreimal mit RIPA (-SDS) gewaschen und mit 75 ng/µl einzelsträngigem Heringsperma und 0,1 µg/µl BSA 30 min bei 4°C vorgeklärt. Nach dem dreimaligen Waschen mit RIPA (-SDS), wurden die *Beads* in dem doppelten Volumen RIPA (-SDS) aufgenommen (hier: 40 µl).

Der Ansatz der Immunpräzipitation wurde in der folgenden Reihenfolge zusammenpipettiert. Je 1 Aliquot à 200 µl Lysat wurde auf 1 ml RIPA (-SDS) aufgefüllt und mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 9) und 40 µl der vorgeklärten *Beads* versehen.

Die Präzipitation erfolgte rotierend über Nacht bei 4°C.

Waschen und Eluieren

Die Präzipitate wurden dreimal mit 600 µl Waschpuffer und zweimal mit 600 µl finalem Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 150 µl Elutionspuffer für 30 min bei 30°C und 1.250 rpm auf dem Heizschüttler. Die Aufhebung der Quervernetzung und die Aufreinigung der DNA erfolgte dann wie bereits oben beschreiben, beginnend mit der Zugabe von RNase A.

Quantifizierung der aufgereinigten DNA

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA erfolgte am *Qubit® 2.0 Fluorometer* von Life Technologies (Thermo Fisher Scientific) mit dem *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* nach Herstellerangaben.

Analyse der DNA über RT-PCR

Die aufgereinigte DNA der Immunpräzipitate und auch der INPUT-Proben wurden mit Hilfe der quantitativen PCR analysiert. Je 1 µl der DNA wurde mit 1x SYBR Green I Mix und je 0,3 µl 5 µM des vorwärts- und des rückwärtsgerichteten Oligonukleotids versehen und mit autoklaviertem MQ auf 25 µl aufgefüllt. Die Auswertung erfolgte nach der „*Percent Input Method*“ von life Technologies (Thermo Fisher Scientific).

4.2.7 Co-Immunpräzipitation (CoIP)

Für eine Co-Immunpräzipitation wurden zwischen einer und drei 15 cm-Zellkulturschalen mit je 1×10^7 Zellen ausgebracht. Nach 24 h wurde je nach Bedarf eine transiente Transfektion angeschlossen und die GOIs mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 48 h induziert. Je nach Durchführung, wurden 24 h vor der Zellernte 300 nM TSA oder das gleiche Volumen DMSO hinzugefügt. Geerntet wurden die Zellen mit 300-900 μl Lysispuffer (+10 mM ATP). Die Lyse erfolgte für 45 min rotierend bei 4°C. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm, 30 min und 4°C pelletiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Alle Proteinkonzentrationen der einzelnen Lysate wurden mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* aufeinander eingestellt. Die Präzipitation erfolgte über einen spezifischen Antikörper und magnetischen Protein A- und G-Beads, die wie in 4.2.6 beschrieben vorgeklärt wurden. Die Lysate (250-400 μl) wurden mit Lysispuffer ad. 1 ml aufgefüllt und mit spezifischen Primärantikörpern (siehe Tabelle 9) und 40-80 μl Beads versehen. Die magnetischen Immunpräzipitate wurden nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad drei- bis fünfmal mit Lysispuffer (+10 mM ATP) gewaschen und in 30-60 μl Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Analyse der CoIP erfolgte über SDS-PAGE mit Antikörpern gegen mögliche Bindepartner der präzipitierten Proteine.

4.3 Zellbiologische Methoden

Um eine Kontamination der Säugerzellen zu vermeiden wurden alle Arbeiten an Sterilbänken durchgeführt. Die in Tabelle 4 aufgeführten Medien wurden jeweils mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin und mit 100 U Penicillin/100 μg Streptomycin versetzt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung der verwendeten Zellen (siehe Tabelle 11) erfolgte bei 37°C; 5-7,5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

4.3.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

HEK293T-Zellen wurden alle 2-3 Tage subkultiviert, um eine maximale Konfluenz von etwa 80 % nicht zu überschreiten. Hierzu wurden die Zellen chemisch mit Hilfe von je 1-2 ml Accutase oder Trypsin pro 10 cm Zellkulturplatte abgelöst. Nach dem Passagieren sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 20-30 % haben. Die Accutasereaktion wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Bei der Verwendung von Trypsin wurden die Zellen vor der Zugabe von Medium mit PBS gewaschen.

4.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die SEM- und RS4;11-Zellen wurden alle 3-4 Tage subkultiviert. Hierzu wurde ein Teil der Zellsuspension mit frischem RPMI-Medium aufgefüllt, um immer einen Teil des konditionierten Mediums beizubehalten. Die Zellen durften hierbei eine Konfluenz von 40-50 % nicht unterschreiten, da sonst ein Proliferationsstopp zu beobachten war.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Für zellbasierte Versuche oder für Transfektionen musste eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgebracht werden. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe des Zellzählers TC10 von Bio-Rad quantifiziert. 10 µl der Zellsuspension aus zuvor mit Accutase vereinzelt Zellen wurden mit dem gleichen Volumen einer 0,4 %-igen Trypan-Blau-Lösung gemischt und auf den Messschlitten des Zellzählers gegeben. Die Konzentration wurde in Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl pro Milliliter sowie der prozentualen Lebendzellzahl angegeben.

4.3.4 Transfektionen

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA über Plasmide entweder transient eingebracht oder stabil in das Genom der eukaryotischen Zellen über konservative Transposition integriert. Bei der stabilen Transfektion wurden die *Sleeping Beauty*-Konstrukte (pTR und pSBtet) zusammen mit einem für die Transposase kodierenden Plasmid (pcGlobin SB100_{xco}) co-transfiziert.

4.3.4.1 Stabile und transiente Transfektionen von HEK293T-Zellen mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimin bildet Komplexe mit der hinzugefügten Plasmid-DNA und gewährleistet so eine Anlagerung an Zellmembranen und eine Aufnahme über Endozytose.

Es wurden pro 10 cm Zellkulturschale 1×10^6 Zellen und pro 15 cm Zellkulturschale 1×10^7 Zellen ausgebracht. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die PEI-Transfektionslösung wurde wie folgt hergestellt: Für eine 10 cm Schale wurden 180 µl PBS mit 36 µl 10 mM PEI (Lösung A) und 180 µl PBS mit 10 µg DNA (Lösung B) vermischt. Lösung B wurde tropfenweise unter Vortexen in Lösung A getropft. Für eine 15 cm Platte wurden dieselben beiden Lösungen mit je 450 µl PBS, 90 µl 10 mM PEI und 25 µg DNA angesetzt. Für eine stabile Transfektion wurde ein Zwanzigstel der jeweiligen DNA durch pcGlobin SB100_{xco} ersetzt. Nach einer Inkubation

für 15 min bei RT wurde die Lösung gleichmäßig über die Platte verteilt. Zwei Stunden nach der Transfektion wurde die Expression der GOIs mit 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Nach einer stabilen Transfektion wurde mit Hilfe der Selektionsmarker der pSBtet- bzw. der pTR-Vektoren eine homogen transfizierte Zellpopulation generiert, indem die Zellen in mehreren Etappen mit dem jeweiligen Antibiotikum behandelt wurden (Puromycin 2 µg/ml; Blastocidin S 8 µg/ml; Hygromycin B 300 mg/ml).

4.3.4.2 Transfektion der Suspensionszelllinie SEM/Nukleofektion

Die Suspensionszelllinie SEM wurde mit Hilfe des *Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit R* und dem *Nucleofector[™] 2b* von Lonza nach Herstellerangaben transfiziert. Diese Transfektionsmethode beruht auf dem Prinzip der Elektroporation, wobei kurze elektrische Impulse das Membranpotenzial der Zelle stören, sodass sich Poren bilden, durch die die DNA aufgenommen werden kann. Da für die Zelllinie SEM kein Protokoll vorgegeben war, wurden verschiedene Varianten auf ihre Effizienz hin untersucht und es zeigte sich, dass mit dem Kit R und dem Programm T-016 die höchste Transfektionsrate erreicht werden konnte und die Zellen nach der Nukleofektion über Wochen lebensfähig waren. Die Selektion der positiv-transfizierten Zellen und die Induktion der GOIs durch Doxycyclin erfolgt wie in 4.3.4.1 beschrieben.

4.3.5 Anregung der verschiedenen Fluoreszenzmarker

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops *Observer Z1* von Carl Zeiss und der Software *Velocity* 4.2.1 von Improvision konnten die verschiedenen Fluoreszenzmarker in den Zellen sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden die Marker mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt und die Lichtemission gemessen (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzmarker.

Fluoreszenzmarker	Absorption/Emission [nm]
BFP	365/468
GFP	466/525
mCherry	562/641

4.3.6 Herstellung von Dauerkulturen

Um eukaryotische Zellen als Dauerkultur in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C aufzubewahren, wurden etwa 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen in einem Milliliter eines Gemischs aus 90 % FBS und 10 % DMSO aufgenommen und in Cryo.S-Gefäße überführt.

4.3.7 Viabilitätsmessung/Zytotoxizitätsmessung mittels CCK-8

Je 5×10^3 SEM-Zellen pro 100 μl wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgebracht und die Expression der pSBtet-Konstrukte mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Nach der Zugabe von 100 nM TSA bzw. der gleichen Menge DMSO und einer Inkubationszeit von ein bis vier Tagen erfolgte die photometrische Viabilitätsbestimmung. Drei Stunden vor der Endpunktmessung wurden hierzu je 10 μl CCK-8 Reagenz hinzugefügt. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz (WST-8) wird durch Dehydrogenasen lebender Zellen zu orangefarbenem WST-8-Formazan reduziert. Die Menge des Redox-Indikators steht somit in proportionalem Zusammenhang zu der Anzahl der lebenden Zellen eines Reaktionsansatzes. Der Farbumschlag wurde photometrisch durch die Absorptionsmessung mit Hilfe des *VarioSkan* von Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

4.3.8 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung (PI)

Für die Zellzyklusanalyse wurden 5×10^6 SEM-Zellen, denen sowohl der Leervektor, als auch der IRX1-exprimierende Vektor stabil ins Genom integriert wurden, für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 1.200 rpm) und mit 500 μl PBS gewaschen. Es folgte eine zweite Zentrifugation für 10 min bei 2000 rpm. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und tropfenweise in 4,5 ml eiskaltes, 80 %-iges Ethanol unter Vortexen pipettiert. Das 15 ml Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert und mind. über Nacht bei -20°C gelagert.

Für die Propidiumiodidfärbung wurden die fixierten Zellen für 5 min bei 1.800 rpm pelletiert und mit 5 ml PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 2.300 rpm wurde das Pellet in 500 μl PBS aufgenommen und in Reaktionsgefäße mit je 500 μl 0,25 % Triton X-100 überführt und geschüttelt. Um die Zellen zu permeabilisieren inkubierte die Suspension bei -20°C für 5 min. Die Zellen wurden bei 4.000 rpm 5 min pelletiert, mit 500 μl PBS gewaschen und in 600 μl *Staining-Puffer* aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

4.4 Datenverarbeitung

Die während dieser Arbeit generierten Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 2010 von Microsoft Corporation erstellt. Die Diagramme sowie die Berechnung der Standardfehler S.E.M. und der Signifikanzen wurden mit Hilfe der Software GaphPad Prism 6 von GraphPad Software Inc. angefertigt. Die Auswertungen der FACS-Analysen erfolgte mit Hilfe der FCS Express 4 Flow (RUO) Software von De Novo.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AA	Acrylamid
ad.	auffüllen auf
AF4	<i>ALL-1 fused gene on chromosome 4</i>
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BFP	<i>blue fluorescent protein</i> (blau fluoreszierendes Protein)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwertzyklus)
Da/kDA	Dalton/Kilodalton
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR	<i>early growth response</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FLAG	Polypeptid zur Markierung von Proteinen (DYKDDDDK)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEP	Genexpressionsprofil
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GOI	<i>gene of interest</i>
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HEK293T	Embryonale Nierenzellen (siehe auch 4.1.9.1)
HCl	Salzsäure
HOX	Homöobox
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IRX1	Iroquois1
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton

kg	Kilogramm
LV	Leervektor
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
mM	Millimolar
MQ	„Milli-Q“, Ultrareines Wasser Typ 1
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NP-40 (IGEPAL)	(p-tert-octylphenoxy)polyethoxyethanol
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„ <i>Real Time</i> “-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	B-Zell-Vorläuferzelle mit t(4;11) (siehe auch 4.1.9.1)
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
TSA	Trichostatin A
TSS	<i>transcription start side</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	(p-tert-Octylphenoxy) polyethoxyethanol
Tween® 20	Polyoxyethylen-20-sorbitan-monolaurat
Tx	Transkription
versch.	verschiedene
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat. Rev. Cancer* 2, 777–785.

Adamowicz, M., Radlwimmer, B., Rieker, R.J., Mertens, D., Schwarzbach, M., Schraml, P., Benner, A., Lichter, P., Mechttersheimer, G., Joos, S. (2006). Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 45, 829–838.

Ahmad, K., Katryniok, C., Scholz, B., Merkens, J., Löscher, D., Marschalek, R., Steinhilber, D. (2014). Inhibition of class I HDACs abrogates the dominant effect of MLL-AF4 by activation of wild-type MLL. *Oncogenesis* 3, e127.

Alexander, F.E., Patheal, S.L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M.E., Chan, L.C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J.C., Gu, L.J., *et al.* (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res.* 61, 2542–2546.

Alharbi, R.A., Pettengell, R., Pandha, H.S., Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27, 1000–1008.

Ali, M., Hom, R.A., Blakeslee, W., Ikenouye, L., Kutateladze, T.G. (2014). Diverse functions of PHD fingers of the MLL/KMT2 subfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 366–371.

Allen, M.D., Grummitt, C.G., Hilcenko, C., Min, S.Y., Tonkin, L.M., Johnson, C.M., Freund, S.M., Bycroft, M., Warren, A.J. (2006). Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase. *EMBO J.* 25, 4503–4512.

Andersson, A.K., Ma, J., Wang, J., Chen, X., Gedman, A.L., Dang, J., Nakitandwe, J., Holmfeldt, L., Parker, M., Easton, J., *et al.* (2015). The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat. Genet.* 47, 330–337.

Andreeff, M., Ruvolo, V., Gadgil, S., Zeng, C., Coombes, K., Chen, W., Kornblau, S., Barón, A.E., Drabkin, H.A. (2008). HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 22, 2041–2047.

Anglin, J.L. und Song, Y. (2013). A medicinal chemistry perspective for targeting histone H3 lysine-79 methyltransferase DOT1L. *J. Med. Chem.* 56, 8972–8983.

Anglin, J.L., Deng, L., Yao, Y., Cai, G., Liu, Z., Jiang, H., Cheng, G., Chen, P., Dong, S., Song, Y. (2012). Synthesis and structure-activity relationship investigation of adenosine-containing inhibitors of histone methyltransferase DOT1L. *J. Med. Chem.* 55, 8066–8074.

Antonchuk, J., Sauvageau, G., Humphries, R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 109, 39–45.

Aplan, P.D., Chervinsky, D.S., Stanulla, M., Burhans, W.C. (1996). Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 87, 2649–2658.

Argiropoulos, B., Humphries, R.K. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 26, 6766–6776.

Armstrong, S.A., Staunton, J.E., Silverman, L.B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M.D., Sallan, S.E., Lander, E.S., Golub, T.R., Korsmeyer, S.J. (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* 30, 41–47.

- Avdic, V., Zhang, P., Lanouette, S., Groulx, A., Tremblay, V., Brunzelle, J., Couture, J.-F. (2011). Structural and biochemical insights into MLL1 core complex assembly. *Struct. Lond. Engl.* 19, 101–108.
- Ayton, P.M. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on *Hoxa7* and *Hoxa9*. *Genes Dev.* 17, 2298–2307.
- Ayton, P.M. und Cleary, M.L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 20, 5695–5707.
- Ayton, P.M., Chen, E.H., Cleary, M.L. (2004). Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10470–10478.
- Bach, C., Buhl, S., Mueller, D., García-Cuellar, M.-P., Maethner, E., Slany, R.K. (2010). Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* 115, 2910–2918.
- Baker, S.J. und McKinnon, P.J. (2004). Tumour-suppressor function in the nervous system. *Nat. Rev. Cancer* 4, 184–196.
- Bannister, A.J., und Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641–643.
- Bardini, M., Spinelli, R., Bungaro, S., Mangano, E., Corral, L., Cifola, I., Fazio, G., Giordan, M., Basso, G., De Rossi, G., *et al.* (2010). DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia* 24, 169–176.
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.
- Benedikt, A., Baltruschat, S., Scholz, B., Bursen, A., Arrey, T.N., Meyer, B., Varagnolo, L., Müller, A.M., Karas, M., Dinger, T., *et al.* (2011). The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* 25, 135–144.
- Benito, J.M., Godfrey, L., Kojima, K., Hogdal, L., Wunderlich, M., Geng, H., Marzo, I., Harutyunyan, K.G., Golfman, L., North, P., *et al.* (2015). MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Rep.* 13, 2715–2727.
- Bennett, K.L., Karpenko, M., Lin, M.-T., Claus, R., Arab, K., Dyckhoff, G., Plinkert, P., Herpel, E., Smiraglia, D., Plass, C. (2008). Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 68, 4494–4499.
- Bennett, K.L., Romigh, T., Eng, C. (2009). Disruption of transforming growth factor-beta signaling by five frequently methylated genes leads to head and neck squamous cell carcinoma pathogenesis. *Cancer Res.* 69, 9301–9305.
- Bernt, K.M., Zhu, N., Sinha, A.U., Vempati, S., Faber, J., Krivtsov, A.V., Feng, Z., Punt, N., Daigle, A., Bullinger, L., *et al.* (2011). MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* 20, 66–78.
- Betti, C.J., Villalobos, M.J., Diaz, M.O., Vaughan, A.T.M. (2003). Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division. *Cancer Res.* 63, 1377–1381.
- Bilioni, A., Craig, G., Hill, C., McNeill, H. (2005). Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14671–14676.

- Bitoun, E., Oliver, P.L., Davies, K.E. (2007). The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum. Mol. Genet.* 16, 92–106.
- Blobel, G.A., Kadauke, S., Wang, E., Lau, A.W., Zuber, J., Chou, M.M., Vakoc, C.R. (2009). A reconfigured pattern of MLL occupancy within mitotic chromatin promotes rapid transcriptional reactivation following mitotic exit. *Mol. Cell* 36, 970–983.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784.
- Borkin, D., He, S., Miao, H., Kempinska, K., Pollock, J., Chase, J., Purohit, T., Malik, B., Zhao, T., Wang, J., *et al.* (2015). Pharmacologic inhibition of the Menin-MLL interaction blocks progression of MLL leukemia in vivo. *Cancer Cell* 27, 589–602.
- Bosse, A., Zülch, A., Becker, M.B., Torres, M., Gómez-Skarmeta, J.L., Modolell, J., Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.* 69, 169–181.
- Bosse, A., Stoykova, A., Niesel-Stuwe, K., Chowdhury, K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Gruss, P. (2000). Identification of a novel mouse Iroquois homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse Iroquois gene family. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 218, 160–174.
- Botbol, Y., Raghavendra, N.K., Rahman, S., Engelman, A., Lavigne, M. (2008). Chromatinized templates reveal the requirement for the LEDGF/p75 PWWP domain during HIV-1 integration in vitro. *Nucleic Acids Res.* 36, 1237–1246.
- Broeker, P.L., Super, H.G., Thirman, M.J., Pomykala, H., Yonebayashi, Y., Tanabe, S., Zeleznik-Le, N., Rowley, J.D. (1996a). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 87, 1912–1922.
- Broeker, P.L., Harden, A., Rowley, J.D., Zeleznik-Le, N. (1996b). The mixed lineage leukemia (MLL) protein involved in 11q23 translocations contains a domain that binds cruciform DNA and scaffold attachment region (SAR) DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211, 259–268.
- Bruhl, T., Urbich, C., Aicher, D., Acker-Palmer, A., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2004). Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation. *Circ. Res.* 94, 743–751.
- Bruneau, B.G., Bao, Z.Z., Tanaka, M., Schott, J.J., Izumo, S., Cepko, C.L., Seidman, J.G., Seidman, C.E. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev. Biol.* 217, 266–277.
- Bueno, C., Montes, R., Melen, G.J., Ramos-Mejia, V., Real, P.J., Ayllón, V., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Fernández, A.F., *et al.* (2012). A human ESC model for MLL-AF4 leukemic fusion gene reveals an impaired early hematopoietic-endothelial specification. *Cell Res.* 22, 986–1002.
- Bursen, A., Schwabe, K., Rüster, B., Henschler, R., Ruthardt, M., Dingermann, T., Marschalek, R. (2010a). The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115, 3570–3579.
- Bursen, A., Schwabe, K., Rüster, B., Henschler, R., Ruthardt, M., Dingermann, T., Marschalek, R. (2010b). The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115, 3570–3579.

- Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Spiekermann, K., Eaves, C.J., Coulombel, L., Sauvageau, G., Hogge, D.E., Humphries, R.K. (2002). Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100, 862–868.
- Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P. (2002). Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21, 4247–4256.
- Cavodeassi, F., Modolell, J., Gómez-Skarmeta, J.L. (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2847–2855.
- Chen, C.-W., Koche, R.P., Sinha, A.U., Deshpande, A.J., Zhu, N., Eng, R., Doench, J.G., Xu, H., Chu, S.H., Qi, J., *et al.* (2015). DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. *Nat. Med.* 21, 335–343.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1/waf1}. *Science* 287, 1804–1808.
- Chillón, M.C., Gómez-Casares, M.T., López-Jorge, C.E., Rodriguez-Medina, C., Molines, A., Sarasquete, M.E., Alcoceba, M., Miguel, J.D.G.-S., Bueno, C., Montes, R., *et al.* (2012). Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 2360–2366.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840.
- Cierpicki, T. und Grembecka, J. (2014). Challenges and opportunities in targeting the menin-MLL interaction. *Future Med. Chem.* 6, 447–462.
- Cierpicki, T., Risner, L.E., Grembecka, J., Lukasik, S.M., Popovic, R., Omonkowska, M., Shultis, D.D., Zeleznik-Le, N.J., Bushweller, J.H. (2010). Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 62–68.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63.
- Daigle, S.R., Olhava, E.J., Therkelsen, C.A., Majer, C.R., Sneeringer, C.J., Song, J., Johnston, L.D., Scott, M.P., Smith, J.J., Xiao, Y., *et al.* (2011). Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell* 20, 53–65.
- Daigle, S.R., Olhava, E.J., Therkelsen, C.A., Basavapathruni, A., Jin, L., Boriack-Sjodin, P.A., Allain, C.J., Klaus, C.R., Raimondi, A., Scott, M.P., *et al.* (2013). Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* 122, 1017–1025.
- Dawson, M.A., Prinjha, R.K., Dittmann, A., Giotopoulos, G., Bantscheff, M., Chan, W.-I., Robson, S.C., Chung, C., Hopf, C., Savitski, M.M., *et al.* (2011). Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 478, 529–533.
- Day, T.K. und Bianco-Miotto, T. (2013). Common gene pathways and families altered by DNA methylation in breast and prostate cancers. *Endocr. Relat. Cancer* 20, R215-232.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M.-J., Basinko, A., Morel, F., De Braekeleer, M. (2012). Gene expression profiling of adult t(4;11)(q21;q23)-associated acute lymphoblastic leukemia reveals a different signature from pediatric cases. *Anticancer Res.* 32, 3893–3899.
- Deaton, A.M. und Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.

- Deshpande, A.J., Bradner, J., Armstrong, S.A. (2012). Chromatin modifications as therapeutic targets in MLL-rearranged leukemia. *Trends Immunol.* **33**, 563–570.
- Dharmarajan, V., Lee, J.-H., Patel, A., Skalnik, D.G., Cosgrove, M.S. (2012). Structural basis for WDR5 interaction (Win) motif recognition in human SET1 family histone methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **287**, 27275–27289.
- Dobson, C.L., Warren, A.J., Pannell, R., Forster, A., Rabbitts, T.H. (2000). Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *EMBO J.* **19**, 843–851.
- Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res. MCR* **5**, 981–989.
- Domer, P.H., Head, D.R., Renganathan, N., Raimondi, S.C., Yang, E., Atlas, M. (1995). Molecular analysis of 13 cases of MLL/11q23 secondary acute leukemia and identification of topoisomerase II consensus-binding sequences near the chromosomal breakpoint of a secondary leukemia with the t(4;11). *Leukemia* **9**, 1305–1312.
- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L., Roeder, R.G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**, 873–885.
- Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D., Roeder, R.G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 713–719.
- Drabkin, H.A., Parsy, C., Ferguson, K., Guilhot, F., Lacotte, L., Roy, L., Zeng, C., Baron, A., Hunger, S.P., Varella-Garcia, M., *et al.* (2002). Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **16**, 186–195.
- Driessen, E.M.C., van Roon, E.H.J., Spijkers-Hagelstein, J.A.P., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R., Stam, R.W. (2013). Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* **98**, 937–944.
- Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., Chiao, J.H., Reilly, J.F., Ricker, J.L., Richon, V.M., *et al.* (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* **109**, 31–39.
- Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125**, 2605–2613.
- Erfurth, F.E., Popovic, R., Grembecka, J., Cierpicki, T., Theisler, C., Xia, Z.-B., Stuart, T., Diaz, M.O., Bushweller, J.H., Zeleznik-Le, N.J. (2008). MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7517–7522.
- Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R.H., Korsmeyer, S.J. (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2249–2258.
- Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A.J., Zon, L.I., Korsmeyer, S.J. (2004). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr. Biol. CB* **14**, 2063–2069.
- Faber, J., Krivtsov, A.V., Stubbs, M.C., Wright, R., Davis, T.N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C.M., Kung, A.L., Armstrong, S.A. (2008). HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* **113**, 2375–2385.
- Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M., Diaz, M.O. (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3589–3597.

- Fan, C., He, L., Kapoor, A., Gillis, A., Rybak, A.P., Cutz, J.-C., Tang, D. (2008). Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 642–648.
- Felix, C.A., Lange, B.J., Chessells, J.M. (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 285–302.
- Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J., Look, A.T. (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102, 262–268.
- Gogol-Döring, A., Ammar, I., Gupta, S., Bunse, M., Miskey, C., Chen, W., Uckert, W., Schulz, T.F., Izsvák, Z., Ivics, Z. (2016). Genome-wide Profiling Reveals Remarkable Parallels Between Insertion Site Selection Properties of the MLV Retrovirus and the piggyBac Transposon in Primary Human CD4+ T Cells. *Mol. Ther.* 24, 592–606.
- Gole, B., Baumann, C., Mian, E., Ireno, C.I., Wiesmüller, L. (2015). Endonuclease G initiates DNA rearrangements at the MLL breakpoint cluster upon replication stress. *Oncogene* 34, 3391–3401.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., *et al.* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531–537.
- Gomez-Skarmeta, J.L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferré-Marcó, D., Modolell, J. (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85, 95–105.
- Goodman, F.R. (2003). Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *Lancet Lond. Engl.* 362, 651–662.
- Gore, S.D., Baylin, S., Sugar, E., Carraway, H., Miller, C.B., Carducci, M., Grever, M., Galm, O., Dausers, T., Karp, J.E., *et al.* (2006). Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res.* 66, 6361–6369.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.
- Greaves, M.F., und Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 3, 639–649.
- Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L., Ford, A.M. (2003). Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 102, 2321–2333.
- Greil, J., Gramatzki, M., Burger, R., Marschalek, R., Peltner, M., Trautmann, U., Hansen-Hagge, T.E., Bartram, C.R., Fey, G.H., Stehr, K. (1994). The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br. J. Haematol.* 86, 275–283.
- Grembecka, J., He, S., Shi, A., Purohit, T., Muntean, A.G., Sorenson, R.J., Showalter, H.D., Murai, M.J., Belcher, A.M., Hartley, T., *et al.* (2012). Menin-MLL inhibitors reverse oncogenic activity of MLL fusion proteins in leukemia. *Nat. Chem. Biol.* 8, 277–284.
- Guenther, M.G., Lawton, L.N., Rozovskaia, T., Frampton, G.M., Levine, S.S., Volkert, T.L., Croce, C.M., Nakamura, T., Canaani, E., Young, R.A. (2008). Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev.* 22, 3403–3408.
- Guo, H.-B. und Guo, H. (2007). Mechanism of histone methylation catalyzed by protein lysine methyltransferase SET7/9 and origin of product specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8797–8802.

- Guo, X., Liu, W., Pan, Y., Ni, P., Ji, J., Guo, L., Zhang, J., Wu, J., Jiang, J., Chen, X., *et al.* (2010). Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma. *Oncogene* 29, 3908–3920.
- Guo, X.B., Guo, L., Zhi, Q.M., Ji, J., Jiang, J.L., Zhang, R.J., Zhang, J.N., Zhang, J., Chen, X.H., Cai, Q., *et al.* (2011). Helicobacter pylori induces promoter hypermethylation and downregulates gene expression of IRX1 transcription factor on human gastric mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 1685–1690.
- Guzman, M.L. (2015). CDK6 is a regulator of stem cells “Egr” to wake up. *Blood* 125, 7–9.
- Han, Y.H., Austin, M.J., Pommier, Y., Povirk, L.F. (1993). Small deletion and insertion mutations induced by the topoisomerase II inhibitor teniposide in CHO cells and comparison with sites of drug-stimulated DNA cleavage in vitro. *J. Mol. Biol.* 229, 52–66.
- Hanson, R.D., Hess, J.L., Yu, B.D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N.M., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H., Seto, M., *et al.* (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14372–14377.
- Hassawi, M., Shestakova, E.A., Fournier, M., Lebert-Ghali, C.-É., Vaisson, G., Frison, H., Sinnott, D., Vidal, R., Thompson, A., Bijl, J.J. (2013). Hoxa9 collaborates with E2A-PBX1 in mouse B cell leukemia in association with Flt3 activation and decrease of B cell gene expression: *Hoxa9* collaborates with *E2A-PBX1* in B Cell Leukemia. *Dev. Dyn.* 243, 145-158.
- Hess, J.L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol. Med.* 10, 500–507.
- Horton, S.J., Grier, D.G., McGonigle, G.J., Thompson, A., Morrow, M., De Silva, I., Moulding, D.A., Kioussis, D., Lappin, T.R.J., Brady, H.J.M., *et al.* (2005). Continuous MLL-ENL expression is necessary to establish a “Hox Code” and maintain immortalization of hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res.* 65, 9245–9252.
- Houweling, A.C., Dildrop, R., Peters, T., Mummenhoff, J., Moorman, A.F., Rüther, U., Christoffels, V.M. (2001). Gene and cluster-specific expression of the Iroquois family members during mouse development. *Mech. Dev.* 107, 169–174.
- Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y., Korsmeyer, S.J. (2003). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 115, 293–303.
- Hu, Y.-L., Passegué, E., Fong, S., Largman, C., Lawrence, H.J. (2007). Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* 109, 4732–4738.
- Hu, Y.-L., Fong, S., Ferrell, C., Largman, C., Shen, W.-F. (2009). HOXA9 modulates its oncogenic partner Meis1 to influence normal hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5181–5192.
- Javed, S. und Langley, S.E.M. (2013). Importance of HOX genes in normal prostate gland formation, prostate cancer development and its early detection. *BJU Int.* 113, 535-540.
- Jiang, J., Liu, W., Guo, X., Zhang, R., Zhi, Q., Ji, J., Zhang, J., Chen, X., Li, J., Zhang, J., *et al.* (2011). IRX1 influences peritoneal spreading and metastasis via inhibiting BDKRB2-dependent neovascularization on gastric cancer. *Oncogene* 30, 4498–4508.
- Jo, S.Y., Granowicz, E.M., Maillard, I., Thomas, D., Hess, J.L. (2011). Requirement for Dot1l in murine postnatal hematopoiesis and leukemogenesis by MLL translocation. *Blood* 117, 4759–4768.
- Kadota, M., Sato, M., Duncan, B., Ooshima, A., Yang, H.H., Diaz-Meyer, N., Gere, S., Kageyama, S.-I., Fukuoka, J., Nagata, T., *et al.* (2009). Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA. *Cancer Res.* 69, 7357–7365.

- Kang, H., Wilson, C.S., Harvey, R.C., Chen, I.-M., Murphy, M.H., Atlas, S.R., Bedrick, E.J., Devidas, M., Carroll, A.J., Robinson, B.W., *et al.* (2012). Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 119, 1872–1881.
- Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Kobayashi, H., Mano, H., Furukawa, Y. (2007). Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest. New Drugs* 25, 31–40.
- Kelly, Z.L., Michael, A., Butler-Manuel, S., Pandha, H.S., Morgan, R.G. (2011). HOX genes in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 4, 16.
- Kerry, J., Godfrey, L., Repapi, E., Tapia, M., Blackledge, N.P., Ma, H., Ballabio, E., O'Byrne, S., Ponthan, F., Heidenreich, O., *et al.* (2017). MLL-AF4 Spreading Identifies Binding Sites that Are Distinct from Super-Enhancers and that Govern Sensitivity to DOT1L Inhibition in Leukemia. *Cell Rep.* 18, 482–495.
- Khan, O. und La Thangue, N.B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol. Cell Biol.* 90, 85–94.
- Kim, K.-H., Rosen, A., Bruneau, B.G., Hui, C., Backx, P.H. (2012). Iroquois homeodomain transcription factors in heart development and function. *Circ. Res.* 110, 1513–1524.
- Kühn A., Löscher D., Marschalek R. (2016). The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t(4;11)- specific cancer mechanism. *Oncotarget.* 7, 35341-35352.
- Klug, W.S., Spencer, C.A., Cummings, M.R. (2007). *Genetik* (München [u.a.]: Pearson Studium).
- Kowarz, E., Löscher, D., Marschalek, R. (2015). Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol. J.* 10, 647–653.
- Krivtsov, A.V., und Armstrong, S.A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* 7, 823–833.
- Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., *et al.* (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355–368.
- Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M., Sauvageau, G. (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J.* 17, 3714–3725.
- Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T., Sauvageau, G. (2001). NUP98–HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J.* 20, 350–361.
- Kuendgen, A., Schmid, M., Schlenk, R., Knipp, S., Hildebrandt, B., Steidl, C., Germing, U., Haas, R., Dohner, H., Gattermann, N. (2006). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106, 112–119.
- Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109, 29–37.
- Lawrence, H.J., Helgason, C.D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D.J., Humphries, R.K., Largman, C. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89, 1922–1930.

- Lawrence, H.J., Christensen, J., Fong, S., Hu, Y.-L., Weissman, I., Sauvageau, G., Humphries, R.K., Largman, C. (2005). Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 3988–3994.
- Le, H., Singh, S., Shih, S.-J., Du, N., Schnyder, S., Loredó, G.A., Bien, C., Michaelis, L., Toor, A., Diaz, M.O., *et al.* (2009). Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 806–815.
- Lee, J.H., Voo, K.S., Skalnik, D.G. (2001). Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 44669–44676.
- Lewis, M.T., Ross, S., Strickland, P.A., Snyder, C.J., Daniel, C.W. (1999). Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tissue Res.* 296, 549–554.
- Li, X., Nie, S., Chang, C., Qiu, T., Cao, X. (2006). Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp. Cell Res.* 312, 854–864.
- Li, Z.-Y., Liu, D.-P., Liang, C.-C. (2005). New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia* 19, 183–190.
- Liedtke, M. und Cleary, M.L. (2009). Therapeutic targeting of MLL. *Blood* 113, 6061–6068.
- Lin, C., Smith, E.R., Takahashi, H., Lai, K.-C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Shilatifard, A. (2010). AFF4, a component of the ELL/p-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras can link transcription elongation to leukemia. *Mol. Cell* 37, 429–437.
- Lin, C., Garrett, A.S., De Kumar, B., Smith, E.R., Gogol, M., Seidel, C., Krumlauf, R., Shilatifard, A. (2011). Dynamic transcriptional events in embryonic stem cells mediated by the super elongation complex (SEC). *Genes Dev.* 25, 1486–1498.
- Liu, C., Adamson, E., Mercola, D. (1996). Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11831–11836.
- Liu, H., Cheng, E.H.-Y., Hsieh, J.J.-D. (2007). Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCDdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev.* 21, 2385–2398.
- Liu, T., Zhou, W., Zhang, F., Shi, G., Teng, H., Xiao, J., Wang, Y. (2014a). Knockdown of IRX2 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by the AKT/MMP9 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 10, 169–174.
- Liu, T., Zhou, W., Cai, B., Chu, J., Shi, G., Teng, H., Xu, J., Xiao, J., Wang, Y. (2015). IRX2-mediated upregulation of MMP-9 and VEGF in a PI3K/AKT-dependent manner. *Mol. Med. Rep.* 12, 4346–4351.
- Liu, W., Deng, L., Song, Y., Redell, M. (2014b). DOT1L inhibition sensitizes MLL-rearranged AML to chemotherapy. *PLoS One* 9, e98270.
- Lu, J., Song, G., Tang, Q., Zou, C., Han, F., Zhao, Z., Yong, B., Yin, J., Xu, H., Xie, X., *et al.* (2015). IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF- κ B signaling. *J. Clin. Invest.* 125, 1839–1856.
- Lu, Y., Yu, Y., Zhu, Z., Xu, H., Ji, J., Bu, L., Liu, B., Jiang, H., Lin, Y., Kong, X., *et al.* (2005). Identification of a new target region by loss of heterozygosity at 5p15.33 in sporadic gastric carcinomas: genotype and phenotype related. *Cancer Lett.* 224, 329–337.

- Luo, Z., Lin, C., Shilatifard, A. (2012). The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 543–547.
- Mahoney, S.E., Yao, Z., Keyes, C.C., Tapscott, S.J., Diede, S.J. (2012). Genome-wide DNA methylation studies suggest distinct DNA methylation patterns in pediatric embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Epigenetics* 7, 400–408.
- Mark, M., Rijli, F.M., Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr. Res.* 42, 421–429.
- Marks, P.A. (2010). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 1049–1066.
- Marschalek, R. (2011). Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br. J. Haematol.* 152, 141–154.
- Martorell, Ò., Barriga, F.M., Merlos-Suárez, A., Stephan-Otto Attolini, C., Casanova, J., Batlle, E., Sancho, E., Casali, A. (2014). Iro/IRX transcription factors negatively regulate Dpp/TGF- β pathway activity during intestinal tumorigenesis. *EMBO Rep.* 15, 1210–1218.
- McNeill, H., Yang, C.H., Brodsky, M., Ungos, J., Simon, M.A. (1997). mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* 11, 1073–1082.
- Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., *et al.* (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23, 1490–1499.
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Gröger, D., Park, T.S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villarese, P., Macintyre, E., *et al.* (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 27, 2165–2176.
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., Shilatifard, A. (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12902–12907.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., Hess, J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* 10, 1107–1117.
- Milne, T.A., Dou, Y., Martin, M.E., Brock, H.W., Roeder, R.G., Hess, J.L. (2005a). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14765–14770.
- Milne, T.A., Hughes, C.M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R.W., Krankel, C., Livolsi, V.A., Gibbs, D., *et al.* (2005b). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 749–754.
- Milne, T.A., Martin, M.E., Brock, H.W., Slany, R.K., Hess, J.L. (2005c). Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res.* 65, 11367–11374.
- Milne, T.A., Kim, J., Wang, G.G., Stadler, S.C., Basrur, V., Whitcomb, S.J., Wang, Z., Ruthenburg, A.J., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Roeder, R.G., *et al.* (2010). Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis. *Mol. Cell* 38, 853–863.
- Min, I.M., Pietramaggiori, G., Kim, F.S., Passegué, E., Stevenson, K.E., Wagers, A.J. (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 380–391.

- Mohan, M., Lin, C., Guest, E., Shilatifard, A. (2010a). Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 10, 721–728.
- Mohan, M., Herz, H.-M., Takahashi, Y.-H., Lin, C., Lai, K.C., Zhang, Y., Washburn, M.P., Florens, L., Shilatifard, A. (2010b). Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes Dev.* 24, 574–589.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.-K., Clarke, M.F., Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962–967.
- Molofsky, A.V., He, S., Bydon, M., Morrison, S.J., Pardal, R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* 19, 1432–1437.
- Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M.-P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J.L., *et al.* (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445–4454.
- Munk, K. (2010). Genetik: [fit für den Bachelor] (Stuttgart [u.a.: Thieme]).
- Muntean, A.G., Tan, J., Sitwala, K., Huang, Y., Bronstein, J., Connelly, J.A., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Hess, J.L. (2010). The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell* 17, 609–621.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M., Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 10, 1119–1128.
- Nguyen, A.T., Taranova, O., He, J., Zhang, Y. (2011). DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Blood* 117, 6912–6922.
- Nguyen, H.H., Takata, R., Akamatsu, S., Shigemizu, D., Tsunoda, T., Furihata, M., Takahashi, A., Kubo, M., Kamatani, N., Ogawa, O., *et al.* (2012). IRX4 at 5p15 suppresses prostate cancer growth through the interaction with vitamin D receptor, conferring prostate cancer susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2076–2085.
- O'Donovan, K.J., Tourtellotte, W.G., Millbrandt, J., Baraban, J.M. (1999). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci.* 22, 167–173.
- Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V.M., Su, L., Xu, G., Zhang, Y. (2005). hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* 121, 167–178.
- Okada, Y., Jiang, Q., Lemieux, M., Jeannotte, L., Su, L., Zhang, Y. (2006). Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L. *Nat. Cell Biol.* 8, 1017–1024.
- Olsen, E.A., Kim, Y.H., Kuzel, T.M., Pacheco, T.R., Foss, F.M., Parker, S., Frankel, S.R., Chen, C., Ricker, J.L., Arduino, J.M., *et al.* (2007). Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3109–3115.
- Ordway, J.M., Bedell, J.A., Citek, R.W., Nunberg, A., Garrido, A., Kendall, R., Stevens, J.R., Cao, D., Doerge, R.W., Korshunova, Y., *et al.* (2006). Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis* 27, 2409–2423.
- Oshima, M., Endoh, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Nakajima-Takagi, Y., Sugiyama, F., Koseki, H., Kyba, M., Iwama, A., Osawa, M. (2011). Genome-wide analysis of target genes regulated by

- HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood* 117, e142-150.
- Park, S., Osmers, U., Raman, G., Schwantes, R.H., Diaz, M.O., Bushweller, J.H. (2010). The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 6576–6586.
- Patel, A., Vought, V.E., Dharmarajan, V., Cosgrove, M.S. (2008). A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the mixed lineage leukemia protein-1 core complex. *J. Biol. Chem.* 283, 32162–32175.
- Patel, A., Dharmarajan, V., Vought, V.E., Cosgrove, M.S. (2009). On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *J. Biol. Chem.* 284, 24242–24256.
- Pearson, J.C., Lemons, D., McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* 6, 893–904.
- Peart, M.J., Smyth, G.K., van Laar, R.K., Bowtell, D.D., Richon, V.M., Marks, P.A., Holloway, A.J., Johnstone, R.W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3697–3702.
- Peterlin, B.M. und Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol. Cell* 23, 297–305.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., Rütther, U. (2000). Organization of mouse Iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* 10, 1453–1462.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Johnston, D.M., Hodgson, J.W., Black, K.L., Kovermann, S.K., Beck, S., Canaani, E., Brock, H.W., Mazo, A. (2012). TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication. *Cell* 150, 922–933.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 249–258.
- Placke, T., Faber, K., Nonami, A., Putwain, S.L., Salih, H.R., Heidel, F.H., Krämer, A., Root, D.E., Barbie, D.A., Krivtsov, A.V., *et al.* (2014). Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood* 124, 13–23.
- Popovic, R., Riesbeck, L.E., Velu, C.S., Chaubey, A., Zhang, J., Achille, N.J., Erfurth, F.E., Eaton, K., Lu, J., Grimes, H.L., *et al.* (2009). Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 113, 3314–3322.
- Prelle, C., Bursen, A., Dingermann, T., Marschalek, R. (2013). Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia* 27, 1425-1427.
- Pschyrembel, W. (2007). Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch (Berlin: W. de Gruyter).
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993–1000.
- Ragione, F.D., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., Borriello, A., Zappia, V. (2003). p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *J. Biol. Chem.* 278, 23360–23368.
- Ramanathan, Y., Rajpara, S.M., Reza, S.M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M.B., Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J. Biol. Chem.* 276, 10913–10920.

- Rao, R.C. und Dou, Y. (2015). Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat. Rev. Cancer* 15, 334–346.
- Ratain, M.J., Kaminer, L.S., Bitran, J.D., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Skosey, C., Purl, S., Hoffman, P.C., Wade, J., Vardiman, J.W. (1987). Acute nonlymphocytic leukemia following etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non-small-cell carcinoma of the lung. *Blood* 70, 1412–1417.
- Rauch, T.A., Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K.H., Wang, Z., Riggs, A.D., Pfeifer, G.P. (2008). High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 252–257.
- Rauch, T.A., Wang, Z., Wu, X., Kernstine, K.H., Riggs, A.D., Pfeifer, G.P. (2012). DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 33, 287–296.
- Reichel, M., Gillert, E., Nilson, I., Siegler, G., Greil, J., Fey, G.H., Marschalek, R. (1998a). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 17, 3035–3044.
- Reichel, M., Gillert, E., Nilson, I., Siegler, G., Greil, J., Fey, G.H., Marschalek, R. (1998b). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 17, 3035–3044.
- Reisenauer, M.R., Anderson, M., Huang, L., Zhang, Z., Zhou, Q., Kone, B.C., Morris, A.P., Lesage, G.D., Dryer, S.E., Zhang, W. (2009). AF17 competes with AF9 for binding to Dot1a to up-regulate transcription of epithelial Na⁺ channel alpha. *J. Biol. Chem.* 284, 35659–35669.
- Richardson, C. und Jasin, M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405, 697–700.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311–1323.
- Rothkamm, K., Kühne, M., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2001). Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 61, 3886–3893.
- Rozovskaia, T., Feinstein, E., Mor, O., Foa, R., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C.M., Cimino, G., Canaani, E. (2001). Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* 20, 874–878.
- Saksouk, N., Simboeck, E., Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8, 3.
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Sato, T., Arai, E., Kohno, T., Takahashi, Y., Miyata, S., Tsuta, K., Watanabe, S., Soejima, K., Betsuyaku, T., Kanai, Y. (2014). Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: Its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Cancer* 135, 319–334.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 9, 1753–1765.

- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M.R., Hugo, P., Lawrence, H.J., Largman, C., Humphries, R.K. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 6, 13–22.
- Schaefer, E.W., Loaiza-Bonilla, A., Juckett, M., DiPersio, J.F., Roy, V., Slack, J., Wu, W., Laumann, K., Espinoza-Delgado, I., Gore, S.D., *et al.* (2009). A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 94, 1375–1382.
- Schäfer, C., Göder, A., Beyer, M., Kiweler, N., Mahendrarajah, N., Rauch, A., Nikolova, T., Stojanovic, N., Wieczorek, M., Reich, T.R., *et al.* (2017). Class I histone deacetylases regulate p53/NF- κ B crosstalk in cancer cells. *Cell. Signal.* 29, 218–225.
- Scheicher, R., Hoelbl-Kovacic, A., Bellutti, F., Tigan, A.-S., Prchal-Murphy, M., Heller, G., Schneckenleithner, C., Salazar-Roa, M., Zöchbauer-Müller, S., Zuber, J., *et al.* (2015). CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. *Blood* 125, 90–101.
- Schuettengruber, B., Simboeck, E., Khier, H., Seiser, C. (2003). Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6993–7004.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N., Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814.
- Serpente, P., Tümpel, S., Ghyselinck, N.B., Niederreither, K., Wiedemann, L.M., Dollé, P., Chambon, P., Krumlauf, R., Gould, A.P. (2005). Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Dev. Camb. Engl.* 132, 503–513.
- Shah, N. und Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 10, 361–371.
- Shah, C.A., Wang, H., Bei, L., Plataniias, L.C., Eklund, E.A. (2011). HoxA10 regulates transcription of the gene encoding transforming growth factor beta2 (TGFbeta2) in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 286, 3161–3176.
- Shah, C.A., Bei, L., Wang, H., Plataniias, L.C., Eklund, E.A. (2012). HoxA10 protein regulates transcription of gene encoding fibroblast growth factor 2 (FGF2) in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 287, 18230–18248.
- Shearer, P., Kapoor, G., Beckwith, J.B., Takashima, J., Breslow, N., Green, D.M. (2001). Secondary acute myelogenous leukemia in patients previously treated for childhood renal tumors: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 23, 109–111.
- Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Köm ves, L.G., Lawrence, H.J., Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3051–3061.
- Shen, W.F., Krishnan, K., Lawrence, H.J., Largman, C. (2001). The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7509–7522.
- Sherr, C.J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737.
- Shilatifard, A., Lane, W.S., Jackson, K.W., Conaway, R.C., Conaway, J.W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* 271, 1873–1876.
- Shiozawa, K., Nakanishi, T., Tan, M., Fang, H.-B., Wang, W., Edelman, M.J., Carlton, D., Gojo, I., Sausville, E.A., Ross, D.D. (2009). Preclinical studies of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) combined with cytosine arabinoside and etoposide for treatment of acute leukemias. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 1698–1707.
- Siegenthaler, W. und Blum, H.E. (2006). *Klinische Pathophysiologie* (Stuttgart: Thieme).

- Slany, R.K. (2009). The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 94, 984–993.
- So, C.W., Lin, M., Ayton, P.M., Chen, E.H., Cleary, M.L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4, 99–110.
- So, C.W., Karsunky, H., Wong, P., Weissman, I.L., Cleary, M.L. (2004). Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood* 103, 3192–3199.
- Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.-M., Regnault, A., García-Peydró, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.-L., Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274–286.
- Southall, S.M., Wong, P.-S., Odho, Z., Roe, S.M., Wilson, J.R. (2009). Structural basis for the requirement of additional factors for MLL1 SET domain activity and recognition of epigenetic marks. *Mol. Cell* 33, 181–191.
- Spaapen, F., van den Akker, G.G.H., Caron, M.M.J., Prickaerts, P., Rofel, C., Dahlmans, V.E.H., Surtel, D.A.M., Paulis, Y., Schweizer, F., Welting, T.J.M., *et al.* (2013). The immediate early gene product EGR1 and polycomb group proteins interact in epigenetic programming during chondrogenesis. *PLoS One* 8, e58083.
- Sparmann, A. und van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 846–856.
- Speleman, F., Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Verhasselt, B., Poppe, B., Van Roy, N., Vandesompele, J., Graux, C., Uyttebroeck, A., *et al.* (2005). A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 19, 358–366.
- Spencer, D.H., Young, M.A., Lamprecht, T.L., Helton, N.M., Fulton, R., O’Laughlin, M., Fronick, C., Magrini, V., Demeter, R.T., Miller, C.A., *et al.* (2015). Epigenomic analysis of the HOX gene loci reveals mechanisms that may control canonical expression patterns in AML and normal hematopoietic cells. *Leukemia* 29, 1279–1289.
- Stam, R.W., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., den Boer, M.L., Pieters, R. (2007). Prognostic significance of high-level FLT3 expression in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 110, 2774–2775.
- Stam, R.W., Schneider, P., Hagelstein, J.A.P., van der Linden, M.H., Stumpel, D.J.P.M., de Menezes, R.X., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R. (2010). Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood* 115, 2835–2844.
- Stein, E.M. und Tallman, M.S. (2015). Mixed lineage rearranged leukaemia: pathogenesis and targeting DOT1L. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 92–96.
- Stong, R.C., Korsmeyer, S.J., Parkin, J.L., Arthur, D.C., Kersey, J.H. (1985). Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood* 65, 21–31.
- Strick, R., Strissel, P.L., Borgers, S., Smith, S.L., Rowley, J.D. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4790–4795.
- Strissel, P.L., Strick, R., Rowley, J.D., Zeleznik-Le, N.J. (1998). An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* 92, 3793–3803.

- Stumpel, D.J.P.M., Schneider, P., Seslija, L., Osaki, H., Williams, O., Pieters, R., Stam, R.W. (2012). Connectivity mapping identifies HDAC inhibitors for the treatment of t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 682–692.
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Golda, T., Stanton, J.J., Swirnoff, A.H., Milbrandt, J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *EMBO J.* 17, 6010–6019.
- Szczepański, T., Harrison, C.J., van Dongen, J.J.M. (2010). Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *Lancet Oncol.* 11, 880–889.
- Takahashi, Y., Westfield, G.H., Oleskie, A.N., Trievel, R.C., Shilatifard, A., Skiniotis, G. (2011). Structural analysis of the core COMPASS family of histone H3K4 methylases from yeast to human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20526–20531.
- Tan, J., Jones, M., Koseki, H., Nakayama, M., Muntean, A.G., Maillard, I., Hess, J.L. (2011). CBX8, a polycomb group protein, is essential for MLL-AF9-induced leukemogenesis. *Cancer Cell* 20, 563–575.
- Thiel, G. und Cibelli, G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J. Cell. Physiol.* 193, 287–292.
- Thiel, A.T., Blessington, P., Zou, T., Feather, D., Wu, X., Yan, J., Zhang, H., Liu, Z., Ernst, P., Koretzky, G.A., *et al.* (2010). MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele. *Cancer Cell* 17, 148–159.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M.R., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., Lawrence, H.J., Largman, C., Humphries, R.K. (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol. Cell. Biol.* 17, 495–505.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99, 121–129.
- Tortora, G.J. und Derrickson, B.H. (2008). *Anatomie und Physiologie* (Weinheim: Wiley-VCH-Verl.).
- Trentin, L., Giordan, M., Dingermann, T., Basso, G., te Kronnie, G., Marschalek, R. (2009). Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Eur. J. Haematol.* 83, 406–419.
- Trentin, L., Bresolin, S., Giarin, E., Bardini, M., Serafin, V., Accordi, B., Fais, F., Tenca, C., De Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., *et al.* (2016). Deciphering KRAS and NRAS mutated clone dynamics in MLL-AF4 paediatric leukaemia by ultra deep sequencing analysis. *Sci. Rep.* 6.
- Tupler, R., Perini, G., Green, M.R. (2001). Expressing the human genome. *Nature* 409, 832–833.
- Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E. (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245–253.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L., and Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302.
- Veraksa, A., Del Campo, M., McGinnis, W. (2000). Developmental Patterning Genes and Their Conserved Functions: From Model Organisms to Humans. *Mol. Genet. Metab.* 69, 85–100.
- Virgili, A., Brazma, D., Reid, A.G., Howard-Reeves, J., Valgañón, M., Chanalaris, A., De Melo, V.A., Marin, D., Apperley, J.F., Grace, C., *et al.* (2008). FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. *Mol. Cytogenet.* 1, 14.

- Voo, K.S., Carlone, D.L., Jacobsen, B.M., Flodin, A., Skalnik, D.G. (2000). Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2108–2121.
- Wächter, K., Kowarz, E., Marschalek, R. (2014). Functional characterisation of different MLL fusion proteins by using inducible Sleeping Beauty vectors. *Cancer Lett.* *352*, 196–202.
- Wang, J., Muntean, A.G., Wu, L., Hess, J.L. (2012). A subset of mixed lineage leukemia proteins has plant homeodomain (PHD)-mediated E3 ligase activity. *J. Biol. Chem.* *287*, 43410–43416.
- Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., *et al.* (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* *472*, 120–124.
- Wang, P., Lin, C., Smith, E.R., Guo, H., Sanderson, B.W., Wu, M., Gogol, M., Alexander, T., Seidel, C., Wiedemann, L.M., *et al.* (2009). Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6074–6085.
- Wang, P., Zhuang, C., Huang, D., Xu, K. (2016). Downregulation of miR-377 contributes to IRX3 deregulation in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* *36*, 247–252.
- Werner, S., Stamm, H., Pandjaitan, M., Kemming, D., Brors, B., Pantel, K., Wikman, H. (2015). Iroquois homeobox 2 suppresses cellular motility and chemokine expression in breast cancer cells. *BMC Cancer* *15*, 896.
- Whittaker, S.J., Demierre, M.-F., Kim, E.J., Rook, A.H., Lerner, A., Duvic, M., Scarisbrick, J., Reddy, S., Robak, T., Becker, J.C., *et al.* (2010). Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4485–4491.
- Wong, M., Polly, P., Liu, T. (2015). The histone methyltransferase DOT1L: regulatory functions and a cancer therapy target. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 2823–2837.
- Wu, S.-Y. und Chiang, C.-M. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* *282*, 13141–13145.
- Xia, Z.-B., Anderson, M., Diaz, M.O., and Zeleznik-Le, N.J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8342–8347.
- Xia, Z.-B., Popovic, R., Chen, J., Theisler, C., Stuart, T., Santillan, D.A., Erfurth, F., Diaz, M.O., Zeleznik-Le, N.J. (2005). The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14028–14033.
- Yano, T., Nakamura, T., Blechman, J., Sorio, C., Dang, C.V., Geiger, B., Canaani, E. (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7286–7291.
- Yardley, D.A., Ismail-Khan, R.R., Melichar, B., Lichinitser, M., Munster, P.N., Klein, P.M., Cruickshank, S., Miller, K.D., Lee, M.J., Trepel, J.B. (2013). Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 2128–2135.
- Yeoh, E.-J., Ross, M.E., Shurtleff, S.A., Williams, W.K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Relling, M.V., Patel, A., *et al.* (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* *1*, 133–143.

- Yokoyama, A. und Cleary, M.L. (2008). Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* 14, 36–46.
- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P.M., Cleary, M.L., Ohki, M. (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, 3710–3718.
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D.J., Kitabayashi, I., Herr, W., Cleary, M.L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5639–5649.
- Yokoyama, A., Somervaille, T.C.P., Smith, K.S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., Cleary, M.L. (2005). The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 123, 207–218.
- Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., Cleary, M.L. (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* 17, 198–212.
- Yokoyama, A., Ficara, F., Murphy, M.J., Meisel, C., Hatanaka, C., Kitabayashi, I., Cleary, M.L. (2013). MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing. *PLoS One* 8, e73649.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174–17179.
- Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505–508.
- Zangrando, A., Dell'orto, M.C., Te Kronnie, G., Basso, G. (2009). MLL rearrangements in pediatric acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias: MLL specific and lineage specific signatures. *BMC Med. Genomics* 2, 36.
- Zeisig, D.T., Bittner, C.B., Zeisig, B.B., García-Cuellar, M.-P., Hess, J.L., Slany, R.K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525–5532.
- Zhang, W., Xia, X., Reisenauer, M.R., Hemenway, C.S., Kone, B.C. (2006). Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC α in an aldosterone-sensitive manner. *J. Biol. Chem.* 281, 18059–18068.
- Zhi, Q., Guo, X., Guo, L., Zhang, R., Jiang, J., Ji, J., Zhang, J., Zhang, J., Chen, X., Cai, Q., *et al.* (2013). Oncogenic miR-544 is an important molecular target in gastric cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 13, 270–275.
- Zhu, B., Mandal, S.S., Pham, A.-D., Zheng, Y., Erdjument-Bromage, H., Batra, S.K., Tempst, P., Reinberg, D. (2005). The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis. *Genes Dev.* 19, 1668–1673.
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., *et al.* (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478, 524–528.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1:** Hämatopoiese.
- Abbildung 2:** Relative Häufigkeit der an das DKKR gemeldeten Erkrankungen nach Diagnose-Hauptgruppen.
- Abbildung 3:** Verteilung der Leukämieinzidenzen der unter 18-Jährigen nach Altersgruppen.
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung des MLL-Proteins mit seinen funktionellen Domänen.
- Abbildung 5:** Klassifikation der Leukämietypen und Fusionspartner.
- Abbildung 6:** Auflistung der Komplexe und Komponenten, die mit den MLL-Fusionspartnern assoziiert sind.
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung der *HOX*-Cluster bei *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*.
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung des humanen *IRX*-Clusters.
- Abbildung 9:** Auswertung des Genexpressionsprofils von transient überexprimiertem *IRX1* in HEK293T-Zellen.
- Abbildung 10:** Schematische Darstellung der *Sleeping Beauty*-Konstrukte der zweiten Generation.
- Abbildung 11:** Inhibierung der *HOXA*-Gene in Anwesenheit von *IRX1* bzw. *IRX2*.
- Abbildung 12:** Co-Immunpräzipitationsversuche des MLL-AF4mCH.
- Abbildung 13:** Chromatin-Immunpräzipitationsversuche zur Aufklärung der funktionellen Eigenschaften der *IRX1*/MLL-AF4mCH-Interaktionen.
- Abbildung 14:** Beeinflussung der MLL-AF4mCH-Komplexkomposition durch die Behandlung mit Trichostatin A.
- Abbildung 15:** Effekt der Trichostatin A-Behandlung auf die Genexpression der *HOXA*-Gene.
- Abbildung 16:** Validierung der reprimierenden Eigenschaften des *IRX1* in der t(4;11)-Zelllinie SEM.
- Abbildung 17:** Darstellung der regulatorischen Effekte der EGR-Proteine auf die *HOXA*-Genexpression.
- Abbildung 18:** Aktivierung der *HOXB4*-Transkription und der Expression seiner Zielgene durch *IRX1*.
- Abbildung 19:** Identifizierung der direkten *IRX1*-Zielgene: *HOXB4* und *MEIS1*.
- Abbildung 20:** Regulierung der Transkription der MLL-FP-Zielgene durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren am Beispiel von MLL-AF4.
- Abbildung 21:** Zusammenfassendes Schaubild der Beeinflussung einer t(4;11)-Leukämie im Zusammenhang mit *IRX1*.

8 TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1:** Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.
- Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.
- Tabelle 3:** Sonstige Materialien und deren Hersteller.
- Tabelle 4:** Verwendete Medien und Zusatzstoffe für die Zellkultur und deren Hersteller.
- Tabelle 5:** Verwendete Nährmedien für *E. coli* und deren Zusammensetzung.
- Tabelle 6:** Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.
- Tabelle 7:** Verwendete Oligonukleotide sortiert nach Verwendung.
- Tabelle 8:** Verwendete Enzyme und deren Hersteller.
- Tabelle 9:** Auflistung der verwendeten primären Antikörper.
- Tabelle 10:** Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.
- Tabelle 11:** Verwendete humane Zelllinien und deren Beschreibung.
- Tabelle 12:** Verwendete Bakterienstämme für Transformationen und deren Genotyp.
- Tabelle 13:** Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzmarker.

9 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Marschalek für die Vergabe dieser spannenden Doktorarbeit, die konstruktive Betreuung, auch während der vorangegangenen Bachelor- und Masterarbeit, sowie für die Hilfe und die Diskussionsbereitschaft bei neuen Ideen und aufkommenden Fragen.

Des Weiteren danke ich Prof. Fürst für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Jenny Merkens für die Hilfe und die tollen Gespräche über all die Jahre und die ebenso spaßige Zeit, die wir zusammen hatten. Ich bedanke mich auch bei Magdalena Hemberger, Anna Siemund und Dr. Claus Meyer, die mir in meinen letzten Monaten im Labor Gesellschaft geleistet und immer für ein positives Arbeitsklima gesorgt haben.

Ich bedanke mich zudem bei allen aktuellen und den ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Marschalek für die wundervollen und lustigen Jahre und eine produktive Zusammenarbeit. Danke an: Dr. Ilse Zündorf, Dr. Adelheid Bursen, Dr. Eric Kowarz, Dr. Fabian Mück, Dr. Denise Löscher, Dr. Christian Engelbrecht, Dr. Katharina Wächter, Magdalena Hemberger, Anna Siemund, Silvia Bracharz, Freia Pfeil, Eva Scholz, Vanessa Luciano, Katja Kerzemann, Sigrid Schickling-Herzog und Valerie Streek.

Danke auch an Dr. Iris Bischoff für die vielen schönen Gespräche sowie für die konstruktiven Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Benjamin, der mir immer dann weitergeholfen hat, wenn ich mal wieder verzweifelt war. Danke für deinen Rückhalt und die wundervolle gemeinsame Promotionszeit am Campus Riedberg.

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Alessa Kühn, die hier vorgelegte Dissertation über die

**„UNTERSUCHUNG DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN RELEVANZ DES
TRANSKRIPTIONSFAKTORS IRX1 IM KONTEXT EINER MLL-AF4-
ASSOZIIERTEN LEUKÄMIE“**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

.....

Unterschrift

11 PERSÖNLICHE DATEN

11.1 Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Name	Alessa Carina Kühn geb. Gramlich
Geburtsdatum	14.08.1987
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

SCHULAUSBILDUNG

1994-1998	Carl-Orff	Grundschule, Bensheim-Fehlh.
1998-2004	Liebfrauenschule	Gymnasium, Bensheim
2004-2007	Goethe-Gymnasium	Gymnasium, Bensheim

AKADEMISCHE LAUFBAHN

WS 07/08 – SoSe 08	Medizin	J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
WS 08/09 – SoSe 11	Biowissenschaften	J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Bachelorarbeit:

„Identifizierung der direkten und indirekten Zielgene des IRX1“

(Institut für Pharmazeutische Biologie)

WS 11/12 – SoSe 13	Molekulare Biowissenschaften	J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
--------------------	---------------------------------	--

Masterarbeit:

„Transkriptionelle Repression von HOX-Genen durch den Homöobox-Transkriptionsfaktor IRX1“

(Institut für Pharmazeutische Biologie)

WS 13 - heute	Promotion	J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
---------------	-----------	--

Dissertation:

„Untersuchung der molekularbiologischen Relevanz des Transkriptionsfaktors IRX1 im Kontext einer MLL-AF4-assoziierten Leukämie“

(Institut für Pharmazeutische Biologie)

11.2 Publikationen, Poster, Vorträge

PUBLIKATIONEN

Kühn A, Löscher D, Marschalek R. The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t(4;11)- specific cancer mechanism. *Oncotarget*. 2016 Jun 7;7(23):35341-52. doi: 10.18632/oncotarget.9241.

POSTER

- › DPhG Jahrestagung 2014, Frankfurt am Main
- › 7th UCT Science Day 2016, Frankfurt am Main

VORTRÄGE/ABSTRACTS

- › XXVII. Annual Meeting Kind-Phillip-Foundation of Leukemia Research 2014, Wilsede
“Investigating the interplay between the Iroquois homeoprotein family and MLL and its derivatives”
- › XXVIII. Annual Meeting Kind-Phillip-Foundation of Leukemia Research 2015, Wilsede
“Investigating the functional interplay of the IRX1/IRX2 homeoprotein family member and MLL fusion proteins”