

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Georg-Speyer-Haus
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. Florian Greten

**Identifizierung von neuen Zielgenen des
Transkriptionsfaktors TAL1**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Benjamin Florian Koch

aus Kronberg/Ts.

Frankfurt am Main, 2018

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Winfried Wels

Korreferentin: Priv. Doz. Dr. Gesine Bug

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1. Einleitung.....	1
2. Regulation der Genexpression	3
2.1. <i>DNA</i>	3
2.2. <i>ncRNA</i>	4
2.3. <i>Transkriptionsfaktoren</i>	4
2.4. <i>Transkription</i>	6
2.5. <i>Translation</i>	6
3. TAL1	6
3.1. <i>Klinische Signifikanz</i>	7
3.2. <i>Expression</i>	7
3.3. <i>TAL1-Komplex</i>	8
3.4. <i>Knockout</i>	9
3.5. <i>Überexpression</i>	11
3.6. <i>Erythropoese</i>	12
3.7. <i>Bisherige Erkenntnisse zur Onkogenese durch TAL1</i>	13
3.8. <i>Virale Assoziationen</i>	14
4. Material und Methoden.....	15
4.1. <i>Chemikalien und Geräte</i>	15
4.2. <i>DNA-/RNA-Methoden</i>	16
4.2.1. <i>Quantitative real-time PCR</i>	16
4.2.2. <i>Lentivirale Vektorklonierung</i>	17
4.3. <i>Zellbiologische Methoden</i>	18
4.3.1. <i>K562-Zellen</i>	18
4.3.2. <i>Herstellung lentiviraler Partikel</i>	19
4.3.3. <i>Transduktion von K562-Zellen</i>	19
4.3.4. <i>Anreicherung lentiviraler Partikel</i>	19
4.4. <i>RNA-Sequenzierung</i>	20
4.4.1. <i>Herstellung der Sequenzierungsbibliotheken</i>	20
4.4.2. <i>Bioinformatik</i>	20
5. Ergebnisse.....	24
5.1. <i>Signifikant expressionsveränderte Transkripte</i>	24
5.1.1. <i>Top 40 herunterregulierte codierende Transkripte</i>	25

5.1.2. Top 40 hochregulierte codierende Transkripte	26
5.1.3. Reduktion auf >2-FC und TAL1-Bindung im TSS-Bereich	27
5.2. GO/KEGG/Co-Expressionsanalysen.....	29
5.2.1. Codierende Transkripte.....	29
5.2.1.1. Herunterregulierte codierende Transkripte	29
5.2.1.1.1. GO/Co-Expressionsanalyse Leukämie	31
5.2.1.1.1.1. GRAP2	31
5.2.1.1.1.2. HEMGN	32
5.2.1.1.1.3. Hämoglobin A-Locus.....	33
5.2.1.1.1.4. PKLR.....	33
5.2.1.1.1.5. HMBS	34
5.2.1.1.1.6. AHI1	34
5.2.1.1.1.7. TCF7	35
5.2.1.1.1.8. MYC.....	35
5.2.1.1.1.9. GFI1B.....	36
5.2.1.1.1.10. SLC2A1.....	37
5.2.1.1.1.11. C11orf21.....	37
5.2.1.1.2. GO und Co-Expressionsanalyse Stammzell-Gene.....	38
5.2.1.1.2.1. SLC7A8.....	38
5.2.1.1.2.2. SLC16A9.....	38
5.2.1.1.2.3. HES6	39
5.2.1.1.3. GO-Term: Entwicklungsprozess.....	40
5.2.1.1.3.1. EGFL7.....	40
5.2.1.1.3.2. RARRES3	40
5.2.1.1.4. GO-Term: Sauerstofftransport.....	41
5.2.1.1.5. GO: Transkriptionsfaktoren	41
5.2.1.1.5.1. CEBPE	41
5.2.1.1.5.2. POU3F2.....	42
5.2.1.1.5.3. KLF15	42
5.2.1.1.6. Weitere herunterregulierte codierende TAL1-Zielgene.....	43
5.2.1.1.6.1. HEPACAM2	43
5.2.1.1.6.2. VBP1	44
5.2.1.1.6.3. ERMAP.....	44
5.2.1.1.6.4. MYL4.....	45
5.2.1.1.6.5. UBE2F.....	45
5.2.1.1.6.6. FAM213B.....	46
5.2.1.1.6.7. NT5M.....	47
5.2.1.2. Hochregulierte codierende Transkripte.....	48

5.2.1.2.1. Hochregulierte Transkriptionsfaktoren.....	50
5.2.1.2.2. NR4A2.....	50
5.2.1.2.3. Zytokin-Zytokin Rezeptor-Interaktionen (KEGG).....	51
5.2.1.2.3.1. IL1RL1.....	51
5.2.1.2.4. ECM-Rezeptor Interaktionen (KEGG).....	52
5.2.1.2.5. KEGG: Hämatopoetische Differenzierung.....	52
5.2.1.2.5.1. FCER2.....	52
5.2.1.2.6. KEGG: TCR.....	53
5.2.1.2.6.1. SH2D2A.....	53
5.2.1.2.7. KEGG: B-Zellrezeptor-Signalweg.....	54
5.2.1.2.8. KEGG: Fokalkontakte.....	55
5.2.1.2.8.1. ITGB7.....	55
5.2.1.2.9. KEGG: Antigen-Präsentierung -und Prozessierung.....	55
5.2.1.2.10. KEGG: JAK-STAT Signalweg.....	56
5.2.1.2.10.1. SOCS1.....	57
5.2.1.2.10.2. PIK3CD.....	58
5.2.1.2.10.3. IL23A.....	58
5.2.1.2.11. KEGG: Wnt-Signalweg.....	59
5.2.1.2.11.1. SOST.....	59
5.2.1.2.11.2. TMEM64.....	60
5.2.1.2.12. Weitere hochregulierte codierende TAL1-Zielgene.....	60
5.2.1.2.12.1. TANK.....	60
5.2.1.2.12.2. BCL3.....	61
5.2.1.2.12.3. ADAM8.....	62
5.2.1.2.12.4. YPEL3.....	62
5.2.1.2.12.5. ATG16L2.....	63
5.2.1.2.12.6. ABCA7.....	64
5.2.1.2.12.7. PBXIP1.....	64
5.2.1.2.12.8. FUCA1.....	65
5.2.1.2.12.9. FRK.....	66
5.2.1.2.12.10. LTBP3.....	66
5.2.1.2.12.11. CMTM6.....	67
5.2.1.2.12.12. TBC1D10A.....	68
5.2.1.2.12.13. TOB2P1.....	68
5.2.1.2.12.14. BTG2.....	69
5.2.1.2.12.15. BCL2A1.....	69
5.2.1.2.12.16. BMF.....	70
5.2.1.2.12.17. PTGS1.....	70
5.2.1.2.12.18. TPI1P2.....	71

5.2.1.2.12.19. PLEC	71
5.2.1.2.12.20. PLA2G16	72
5.3. <i>lncRNA</i>	73
5.3.1. Fold-Verteilung der lncRNA-Zielgene	73
5.3.2. Beispiele der identifizierten lncRNA-Zielgene.....	77
6. Diskussion	83
6.1. <i>Ergebnisse</i>	83
6.2. <i>Hanahan, Weinberg und TAL1-Zielgene</i>	84
6.2.1. Zielgene mit Beitrag zur unabhängigen Proliferation?	84
6.2.2. Zielgene mit Beitrag zu fehlender Proliferationshemmung?	85
6.2.3. Zielgene mit Beitrag zur Verhinderung der Apoptose?	87
6.2.4. Zielgene mit Beitrag zur Zell-Immortalisierung?	88
6.2.5. Zielgene mit Beitrag zur Neo-Angiogenese?	89
6.2.6. Zielgene mit Beitrag zur Gewebeinvasion und Metastasierung?.....	90
6.2.7. Zielgene mit Beitrag zum Energiestoffwechsel?	92
6.2.8. Zielgene mit Beitrag zur Immunevasion?.....	93
6.2.9. Zielgene mit Beitrag zu Tumormikroumgebung.....	93
6.2.10. Zielgene mit Beitrag zur Therapieresistenz?.....	94
6.2.11. lncRNA und Hanahan'sche Prinzipien?.....	95
6.3. <i>Zielgene mit Relevanz in der Erythropoese?</i>	96
6.4. <i>Zielgene mit Beitrag zur Osteogenese?</i>	97
6.5. <i>Knockdown induzierte Genexpressionsveränderungen</i>	98
6.5.1. Herrunterregulierte Gene.....	98
6.5.2. Hochregulierte Gene	99
6.6. <i>Limitationen und methodischen Einschränkungen</i>	99
6.7. <i>Fazit und Ausblick</i>	100
7. Zusammenfassung.....	101
8. Abstract.....	103
9. Literaturverzeichnis	105
10. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11. Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12. Schriftliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA7	ATP-binding cassette sub-family A member 7
AD	Aktivierungsdomäne
ADAM8	ADAM metallopeptidase domain 8
AHI1	Abelson helper integration site 1
AML	Akute myeloische Leuk, äö-ßmie
ATG16L2	Autophagy related 16 like 2
BCL2A1	BCL2 related protein A1
BCL3	B cell leukemia/lymphoma 3
BCR/ABL	Breakpoint cluster region/Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
bp	Basenpaare
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMF	BCL2 modifying factor
BTG2	B-cell translocation gene 2
C11orf21	Chromosome 11 open reading frame 21
CAMKV	CaM kinase like vesicle associated
CD	Cluster of differentiation
CEBPE	CAAT/enhancer binding protein, epsilon
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN1a/p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
cDNA	Komplementäre DNA
CK II α	Casein Kinase II α
CLP	Common lymphoid progenitor
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Common myeloid progenitor
CMTM6	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 6
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E-Box	CANNTG, N= jede Nukleobase
E2A	Transcription factor E2-alpha
E2F	E2F Familie von TF
EBV	Epstein Bar-Virus
EGFL7	EGF-like domain-containing protein 7
ERMAP	Erythroid membrane-associated protein
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorter)
FAM213B	Prostamide/prostaglandin F synthase
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II, CD23

FCS	Fetales Kälberserum
FRK	Fyn-related kinase
FWD	Forward
FUCA1	Alpha-L-fucosidase 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA1	GATA-binding factor 1
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GF11B	Growth factor independent 1B transcriptional repressor
GO	Gene ontology
GRAP2	GRB2 related adaptor protein 2
GRN	Genregulatorische Netzwerke
h	human
H2O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HbA	Hämoglobin A
HEMGN	Hemogen
HEPACAM2	HEPACAM family member 2
HES6	Hes family bHLH transcription factor 6
hESC	humane embryonalen Stammzellen
HLH	Helix-Loop-Helix
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HSC	Hematopoietic stem cell
HTLV-1	Humanes T-Lymphotropes Virus-1
ID1	Inhibitor of Differentiation 1
IL	Interleukin
IL1RL1	Interleukin-1 receptor-like 1
ITGB7	Integrin beta 7
kb	Kilobasenpaare
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KLF15	Krüppel-like factor 15
LAT	Linker for activation of t cells
LCP2	Lymphocyte cytosolic protein 2
LCR	Locus-Kontrollregion
LDB1	LIM domain-binding protein 1
LMO2	LIM domain only 2
lncRNA	lange nichtkodierende RNA (long non-coding RNA)
LT	long-term
LTBP3	Latent transforming growth factor beta binding protein 3
M	Mol
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCS	Multi-species conserved sequence
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minuten

ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-Myc
MYL4	Myosin, light chain 4
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ncRNA	nichtkodierende RNA (non-coding RNA)
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2
NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial
O ₂	Sauerstoff
p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
p53	Tumor suppressor p53
PCA	Hauptkomponenten-Analyse
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Paired end
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform
PKLR	Pyruvate kinase, liver and red blood cell
POU3F2	POU domain class 3 transcription factor 2
pTα	Pre-T cell receptor α-Chain
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 COX1
PBXIP1	Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1
PLA2G16	HRAS-like suppressor 3
PLEC	Plectin
RAG1	Recombination Activating Gene 1
RAG2	Recombination Activating Gene 2
RARRES3	Retinoic acid receptor responder protein 3
Rb	Retinoblastom-Protein
REV	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenzen
RT	Reverse Transkription
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
s	Sekunde
SCID	Severe combined immunodeficient
SCL	Stem Cell Leukemia, heute TAL1
SH2D2A	SH2 domain containing 2A
shRNA	Short hairpin RNA

SIL	SCL interrupting locus
SLC2A1	Solute carrier family 2 member 1
SLC7A8	Solute carrier family 7 member 8
SLC16A9	Solute carrier family 16 member 9
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SOST	Sclerostin
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
Tab.	Tabelle
T-Ag	T Antigen
T-ALL	Akute T-Zellleukämie
TAL1	T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1
TANK	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator
Tax	Transactivator encoded by the X region
TBC1D10A	TBC1 domain family member 10A
TCF7	Transcription factor 7
TCR	T-Zell-Rezeptor
TOB2P1	Transducer of ERBB2, 2 pseudogene 1
TPI1P2	Triosephosphate isomerase 1 pseudogene 2
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindestellen
TM	Schmelztemperatur
TMEM64	Transmembrane protein 64
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TSS	Transcription start site
UBE2F	NEDD8-conjugating enzyme UBE2F
v-ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene
VBP1	VHL binding protein 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YPEL3	Yippee like 3
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispiel bHLH-TF	4
Abb. 2: TAL1-Komplex in erythroiden Zellen	8
Abb. 3: TAL1-Komplex in leukämischen	8
Abb. 4: Klassisches Modell der Hämatopoese	10
Abb. 5: Genregulatorisches Netzwerk der hämatopoetischen Stammzellen	11
Abb. 6: Erythropoese	13
Abb. 7: Kumulative Inzidenz von Leukämien und Lymphomen	14
Abb. 8: Vektor	18
Abb. 9: Modifizierter Vektor SEW_shRNA	18
Abb. 10: Analyse der Readqualität	21
Abb. 11: Tophat und Cufflinks-Befehle	21
Abb. 12: Verwendete Befehle für Cuffmerge und Cuffdiff	21
Abb. 13: Befehl zur Annotation der TAL1-ChIPseq Peaks	22
Abb. 14: "Pipeline" der RNAseq-Auswertung	23
Abb. 15: Volcano-Plot und Hauptkomponenten Analyse	24
Abb. 16: Kontrolle der Knockdown-Effizienz	24
Abb. 17: Coexpressions-Analyse nach TAL1-Knockdown	29
Abb. 18: Herabregulierte Gene & Beteiligung an biologischen Prozessen	30
Abb. 19: Herabregulierte Gene & betroffene Zellstrukturen	30
Abb. 20: Herabregulierte Gene & Funktionszuordnung	30
Abb. 21: Herabregulierte Gene & KEGG-Signalwegsanalyse	31
Abb. 22: Herabregulierte Gene nach molekularer Signatur	31
Abb. 23: Zielgen GRAP2	32
Abb. 24: Zielgen HEMGN	33
Abb. 25: Zielgene im HBA-Locus	33
Abb. 26: Zielgen PKLR	34
Abb. 27: Zielgen HMBS	34
Abb. 28: Zielgen AHI	35
Abb. 29: Zielgen TCF7	35
Abb. 30: Zielgen MYC	36
Abb. 31: Zielgen GFII1B	36
Abb. 32: Zielgen SLC2A1	37
Abb. 33: Zielgen C11orf21	37
Abb. 34: Zielgen SLC7A8	38
Abb. 35: Zielgen SLC16A9	39
Abb. 36: Zielgen HES6	39
Abb. 37: Zielgen EGFL7	40
Abb. 38: Zielgen RARRES3	41
Abb. 39: Zielgen CEBPE	42
Abb. 40: Zielgen POU3F2	42
Abb. 41: Zielgen KLF15	43
Abb. 42: Zielgen HEPACAM2	43
Abb. 43: Zielgen VBPI	44
Abb. 44: Zielgen ERMAP	44
Abb. 45: Zielgen MYL4	45
Abb. 46: Zielgen UBE2F	46
Abb. 47: Zielgen FAM213B	47
Abb. 48: Zielgen NT5M	47
Abb. 49: Hochregulierte Gene: GO biologische Prozesse	48
Abb. 50: Hochregulierte Gene: GO Zelluläre Verteilung	48
Abb. 51: Hochregulierte Gene & molekulare Funktion	49
Abb. 52: Hochregulierte Gene & relevante KEGG-Signalwege	49
Abb. 53: Hochregulierte Gene & molekulare Signatur	49
Abb. 54: Zielgen NR4A2	50
Abb. 55: Zielgen IL1RL1	51

Abb. 56: Zielgen FCER	52
Abb. 57: KEGG: TCR	53
Abb. 58: Zielgen SH2D2A	54
Abb. 59: KEGG B-Zellrezeptor Signalweg	54
Abb. 60: Zielgen ITGB7	55
Abb. 61: KEGG Antigen-Prozessierung und Präsentation	56
Abb. 62: KEGG JAK-STAT Signalweg	57
Abb. 63: Zielgen SOCSI	57
Abb. 64: Zielgen PIKC3D	58
Abb. 65: Zielgen IL23A	59
Abb. 66: KEGG: Wnt-Signalweg	59
Abb. 67: Zielgen SOST	60
Abb. 68: Zielgen TMEM64	60
Abb. 69: Zielgen TANK	61
Abb. 70: Zielgen BCL3	61
Abb. 71: Zielgen ADAM8	62
Abb. 72: Zielgen YPEL3	63
Abb. 73: Zielgen ATG16L2	63
Abb. 74: Zielgen ABCA7	64
Abb. 75: Zielgen PBXIP1	65
Abb. 76: Zielgen FUCA1	65
Abb. 77: Zielgen FRK	66
Abb. 78: Zielgen LTBP3	67
Abb. 79: Zielgen CMTM6	67
Abb. 80: Zielgen TBC1D10A	68
Abb. 81: Zielgen TOB2P1	68
Abb. 82: Zielgen BTG2	69
Abb. 83: Zielgen BCL2A	70
Abb. 84: Zielgen BMF	70
Abb. 85: Zielgen PTGSI	71
Abb. 86: Zielgen TPIIP2	71
Abb. 87: Zielgen PLEC	72
Abb. 88: Zielgen PLA2G16	72
Abb. 89: log ₂ fold-Verteilung der lncRNA	73
Abb. 90: GO-Darstellung lncRNA	76
Abb. 91: Zielgen: NONHSAG004695	77
Abb. 92: NONHSAG004695 - Struktur und Expression	77
Abb. 93: Zielgen NONHSAG003220	78
Abb. 94: NONHSAG003220: Expression	78
Abb. 95: Zielgen NONHSAG031607	79
Abb. 96: NONHSAG031607: Expression	79
Abb. 97: Zielgen NONHSAG001514	80
Abb. 98: NONHSAG001514: Expression	80
Abb. 99: Zielgene NONHSAG003033, NONHSAG003034	80
Abb. 100: NONHSAG003034 Expression	81
Abb. 101: NONHSAG003033 Expression	81
Abb. 102: Zielgen NONHSAG050736	81
Abb. 103: NONHSAG050736 Expression	82
Abb. 104: Zielgen NONHSAG001368	82
Abb. 105: NONHSAG001368: Expression in Exosomen	83

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Krebsprinzipien nach Hanahan und Weinberg</i>	2
<i>Tab. 2: TAL1-Protein-Interaktionspartner</i>	9
<i>Tab. 3: Verwendete Chemikalien</i>	15
<i>Tab. 4: Verwendete Geräte</i>	15
<i>Tab. 5: Übersicht der verwendeten Kits</i>	16
<i>Tab. 6: qPCR-Programm</i>	17
<i>Tab. 7: Verwendete Primer</i>	17
<i>Tab. 8: Knockdown Oligonukleotide</i>	18
<i>Tab. 9: Top 40 herunterregulierte codierende Transkripte</i>	25
<i>Tab. 10: Top 40 hochregulierte codierende Transkripte</i>	26
<i>Tab. 11: Anzahl der codierenden Transkripte</i>	27
<i>Tab. 12: mindestens 2-fach veränderte Transkripte mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich</i>	29
<i>Tab. 13: Anzahl der lncRNA</i>	73
<i>Tab. 14: Top 40 herunterregulierte lncRNA</i>	75
<i>Tab. 15: Top 40 hochregulierte lncRNA</i>	76

1. Einleitung

Bei malignen Neoplasien handelt es sich um ein uraltes Phänomen; sie werden in humanen Proben bereits in den Zeitraum vor 500.000 Jahren datiert¹. Vor knapp 2500 Jahren verwendete Hippokrates mit "Καρκίνοϛ (*Karkinos*)" das Wort "Krebs" erstmals zur Benennung einer Schwellung, die keine Tendenz zur Spontanheilung zeigte; vergleichbares wird auch in den ältesten medizinischen Überlieferungen aus Ägypten, Indien oder Persien genannt². Man kann annehmen, dass die Entwicklung von komplexen Vielzellern inhärent mit der Potentialität von Neoplasien verbunden ist³. Tatsächlich sind mit dem Zeitpunkt der Entwicklung der Vielzeller neue Gene mit der Funktion von Gatekeepern (Onko- und Tumorsuppressorgene) assoziiert⁴. Maligne Neoplasien können somit als Risiko der Entwicklung von Einzellern zu Vielzellern, auch unter spezifischen Umwelteinflüssen, verstanden werden.

Die Erkennung von Vielzellern und damit auch von neoplastischen Zellen war notwendigerweise auf die Entwicklung von optischen Geräten angewiesen. Diese ermöglichten insbesondere ab dem 17. Jahrhundert⁵ einen rasanten Zugang in eine zuvor unsichtbare Welt. Neoplasien des Bluts wurden jedoch erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts u.a. durch Virchow beschrieben:

*"...Wenn ich daher von weißem Blute spreche, so meine ich in der That ein Blut, in welchem die Proportion zwischen den rothen und farblosen (in Masse weissen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist..."*⁶.

Anstrengungen eine distinkte, gegenüber anderen Zellen verschiedene Krebszelle zu entdecken wurden auf Gehalt und Konfiguration der neu entdeckten Chromosomen übertragen und schliesslich im ausgehenden 19. Jahrhundert Chromosomenanomalien als häufige Eigenschaft von Krebszellen formuliert⁷. Boveri nahm auf Chromosomenebene Onkogene und Tumorsuppressorgene mit seiner Theorie der Krebsentstehung durch unbalancierte Chromosomenverteilungen mit nachfolgenden Veränderungen der *"teilungserzwingenden"* und *"teilungsverhindernden"* Chromosomen vorweg⁸. Allerdings zeigte sich die Krebszelle damals einer einheitlichen Beschreibung nicht zugänglich:

*"...So gaben denn die Färbemethoden neue Gelegenheit zur Prüfung des Chromatingehalts der Kerne und seiner Vertheilung in denselben. Indess auch hier erwies sich gerade die Principlosigkeit als Princip der Krebszellen..."*⁷.

Mit weiteren revolutionären Erkenntnissen aus den Schnittbereichen von Biologie, Chemie und Physik war man seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts an den

molekulargenetischen Quellen maligner Neoplasien angelangt - und fand sie auf verschlungenen Wegen verschlüsselt vor. Zahlreiche Signalkaskaden in u.a. Proliferation, Angiogenese, Apoptose und Entzündung und eine - die umfassende Therapie zahlreicher Entitäten bislang begrenzende - Komplexität und Heterogenität konnten jedoch seitdem aufgedeckt werden. Fehlten der Biomedizin zum Ende des 19. Jahrhunderts noch die Möglichkeiten allgemeine Prinzipien der Krebszellen zu definieren, so formulierte man die Kanzerogenese schon bald als mehrschrittigen Prozess aus Initiation und Promotion⁹, kam man dann auf der molekularen Ebene über "*two genetic hits*" nach Knudson¹⁰ und das detaillierte *Multistep-Modell* nach Vogelstein und Kinzler¹¹ zur Ordnung von malignen Neoplasien nach den neun Prinzipien von Hanahan und Weinberg (vgl. Tab. 1)^{12,13}.

Prinzipien von Krebszellen:

1. *Teilen sich unabhängig von äusseren Wachstumssignalen,*
2. *reagieren nicht auf wachstumshemmende Signale,*
3. *verhindern Apoptose,*
4. *proliferieren unbegrenzt,*
5. *induzieren Angiogenese,*
6. *sind in der Lage Gewebeinvasion und Metastasierung zu erreichen,*
7. *programmieren den Energiestoffwechsel der Zelle um,*
8. *entgehen dem Immunsystem,*
9. *fördern, erhalten und beschleunigen ihren Status durch Entzündung und Tumor-Mikroumgebung.*

Tab. 1: Krebsprinzipien nach Hanahan und Weinberg

Zur Erforschung von Zelldifferenzierung und ontologischer Transformation bietet die Hämatopoese anhand der bestehenden Methoden, Zelllinien sowie immunologischer und molekularen Marker ein mächtiges experimentelles Modell¹⁴⁻¹⁶. In zahlreichen Experimenten konnten u.a. über die Charakterisierung von strukturellen Chromosomenaberrationen zahlreiche für Entwicklung und Erkrankungen entscheidende Transkriptionsfaktoren (TF) erkannt und die Erarbeitung ihrer das Zellverhalten prägenden räumlichen und zeitlichen Netzwerke begonnen werden. Dies gilt auch für den TF T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1 (TAL1). Ziel dieser Dissertation war die Identifikation von neuen TAL1-Zielgenen. Trotz zahlreicher Erkenntnisse der letzten

Jahrzehnte sind viele noch nicht bekannt, wodurch die Basis feingesteuerter therapeutischer Eingriffe, z.B. eines Cocktails zielgenauer Therapeutika, fehlt.

2. Regulation der Genexpression

TF sind entscheidend an der Kontrolle der Genexpression beteiligt, denn für das Erscheinungsbild einer spezialisierten Zelle ist das räumlich und zeitlich sukzessiv festgelegte Muster der Genexpression kennzeichnend. Dieses realisiert sich im Spannungsfeld zwischen Zellumwelt und Desoxyribonukleinsäure (DNA). Auf dem Weg vom Gen zum Protein bestehen auf zahlreichen Ebenen mannigfaltige Steuerungsmöglichkeiten. Auf jeder Ebene werden u.a. Proliferation, Differenzierung und Apoptose kontrolliert. Unter dem Gesichtspunkt der Sparsamkeit mit den vorhandenen Ressourcen ist jedoch der einzige Schritt, bei dem keine überflüssigen Zwischenprodukte entstehen können die Kontrolle der Genexpression.

2.1. DNA

Die im Nukleus beheimatete humane DNA enthält auf ca. 3,2 Milliarden Basenpaaren (bp) ca. 20.000 proteinogene Gene, bestehend aus regulativen Elementen (cis-aktive Elemente wie CpG-Inseln, proximale und distale Kontrollelemente, Promotor) die für codierende und nicht-codierende Bereiche wirksam werden. Ubiquitär werden durch die DNA-abhängigen Polymerasen ca. 8.000 Gene in messenger RNA (mRNA) übersetzt, prozessiert und aus dem Nukleus exportiert. Hinzutreten ca. 4000 zellspezifische Gene, so dass die Zahl der transkribierten proteinogenen Gene je nach Zelltyp etwa 11.000 bis ca. 13.000 beträgt¹⁷. Pro Zelle bestehen jedoch im Durchschnitt 100.000 bis 200.000 Regionen mit offenem Chromatin und damit zugänglicher DNA¹⁸. Expression und Translation stehen im Zusammenspiel mit der Mehrheit der nicht-proteinogenen DNA, die überwiegend ebenfalls transkribiert wird¹⁹. Insgesamt ergibt sich aus den unterschiedlichen Verbindungen der cis- und trans-aktiven regulatorischen Elemente (TF, Co-Faktoren) ein exponentieller Anstieg der Kombinationsmöglichkeiten zur Etablierung von genregulatorischen Netzwerken (GRN), die so eine gewebespezifische Genexpression ermöglichen.

2.2. ncRNA

Zu den nicht in Proteine übersetzten RNA (non-coding (nc) RNA) zählen microRNA (definitionsgemäss <20 bp), long non-coding RNA (lncRNA, definitionsgemäss >200 bp), transfer RNA, ribosomale RNA und zahlreiche Weitere. Etwa 98% der transkribierten DNA entsprechen ncRNA, so dass die Variationen im Phänotyp der Spezies wahrscheinlich primär durch diese bedingt sind²⁰. Die entsprechenden 5'- und 3'-Genbereiche, Introns und auch intergenen Regionen, die früher teils mit dem Argument des Frameshift-Schutzes als "Junk-DNA" bezeichnet wurden^{21,22}, dienen zumeist als Matrize für (regulierende) ncRNA²³⁻²⁵ oder enthalten Regulationselemente für Transkription und RNA-Prozessierung. lncRNA können u.a. als Köder (Ablenkung von Zielfaktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) vom eigentlichen Ziel), als Leitstruktur (z.B. Herstellen einer Protein-RNA-DNA-Interaktion), als Anker (Bindung eines Proteinkomplexes an ein DNA-bindendes Protein), als Gerüst eines Multiprotein-Komplexes oder als Enhancer wirken²⁶.

2.3. Transkriptionsfaktoren

Ursächlich für die Transkription von m- und ncRNA werden TF. So werden Proteine bezeichnet, die DNA binden und dadurch die Übersetzung einer Sequenz in RNA regulieren²⁷. Es lassen sich permanent produzierte basale TF, die relativ unspezifisch mit

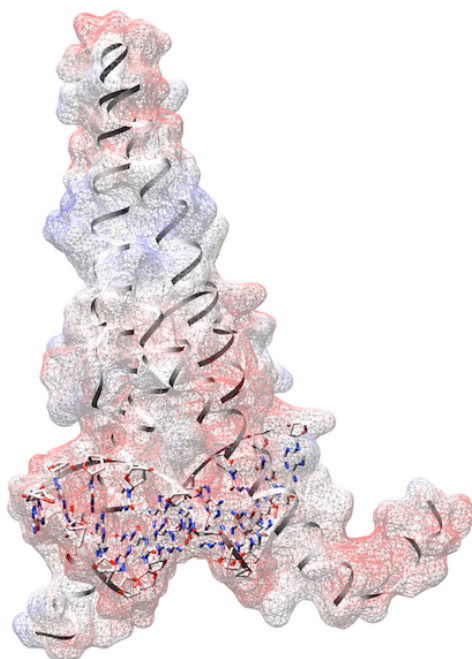


Abb. 1: Beispiel bHLH-TF

Abgebildet ist der bHLH-TF c-MYC gebunden an DNA. Molekulare Oberfläche (Bindungswahrscheinlichkeit in Rot) und Cartoon der Sekundärstrukturen. PDB ID: 1HLO²⁹. Graphik erstellt mit UCSF Chimera³⁰.

der RNA-Polymerase zusammenwirken von den induzierbaren, sequenz- und oft gewebespezifischen TF unterscheiden. Sequenzspezifische TF erkennen ihre zumeist distinkte TF-Bindestellen (TFBS), die gewöhnlich in der grossen Furche der DNA-Doppelhelix liegen und im Allgemeinen eine Konsensussequenz aus teils konservierten, teils variablen Basen mit einer Länge von 6-12 bp aufweisen²⁸.

Das menschliche Genom codiert für ca. 1700 bis 1900 TF³¹, deren Anzahl mit der evolutionären Komplexitätzunahme der Organismen korreliert³². Eine Diversifizierung der Transkriptionssteuerung wird durch die Zusammenarbeit der TF mit zahlreichen Co-Faktoren erzielt, woraus teils eng verwobene, teils entfernter assoziierte fremd- und auch autoregulatorische Schaltkreise (GRN) mit Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-RNA-Interaktionen resultieren³³. Diese GRN regulieren TF über die Einwirkung auf distale (z.B. Enhancer) und proximale (CpG-Inseln, TFBS, Kernpromotor) DNA-Kontrollelemente. Diese Entscheidungen fallen beispielsweise über Aktivierung oder Repression via Ligandenbildung, kovalente Modifikationen, oder Proteolyse, wodurch sich die Konzentration oder Aktivität von TF oder CF wandeln³⁴. Häufig bilden TF Hierarchien, in dem Master-Regulatoren downstream gelegene Zielgene aktivieren, die wiederum für TF codieren können. Somit kann die Entscheidung zur Aktivierung eines einzigen TF eine umfassende Entscheidungskaskade anstoßen. Zur Superfamilie der basischen TF gehören basic Helix-Loop-Helix (bHLH, vgl. Abb. 1) TF wie TAL1 und NeuroD. bHLH-Proteine sind bei zahlreichen Organsystemen (u.a. Hämatopoese, Myogenese, Neurogenese und im Gastro-Intestinal-Trakt) entscheidend an der Steuerung der embryonalen Zelldiversifizierung, embryonalen und adultem Wachstum, Spezialisierung und Apoptose beteiligt^{35,36}. bHLH TF tragen ihren Namen nach der stark konservierten bHLH-Domäne, die für zwei amphipathische Helices mit Verbindung durch eine flexible Schleife codiert. Das HLH-Motiv dient der Dimerisierung und unterstützt die DNA-Zielsequenzerkennung der benachbarten basischen DNA-Bindungsdomäne³⁷. Die HLH-Proteine binden E-Box (CANNTG, N= jede Nukleobase)-Elemente, deren genaue Sequenz und benachbarten Basenpaare die Affinität zu bestimmten HLH-Proteinen bestimmen³⁸. Mit der essentiellen Rolle von TF in Proliferation, Differenzierung und Apoptose ist inhärent bereits das Potential zur Entwicklung von Pathologien im Falle von Alterationen der Funktionsweise angelegt.

2.4. Transkription

Sobald TF, CF und ncRNA die angesteuerte DNA-Sequenz über epigenetische Modifikationen der Transkription zugänglich gemacht haben, kann sich der aus verschiedenen TF und einer Polymerase bestehende Präinitiationskomplex in Gänze bilden und damit die Umschreibung der DNA in RNA initiiert werden. Die an der Regulation der Genexpression beteiligten Faktoren sind jeweils über Netzwerke aus trans-agierenden Faktoren wie TF, CF und zahlreicher interagierende ncRNA-Produkte verbunden^{39,40}. Die resultierenden GRN zeigen charakteristische zeitlich-räumliche Muster^{41,42} und bilden zur Verwirklichung des Körperbauplans positive, negative und intermittierende Feedback-Loops, die auf diese Weise Signalwege und Gene zur Bildung von gewebespezifischen Systemkernen integrieren⁴³⁻⁴⁵.

2.5. Translation

Auf diese Ebene der Transkription setzt die Regulation der Translation (ebenfalls unter Einbezug von ncRNA wie u.a. miRNA und lncRNA), von mRNA-Stabilität, prä-mRNA Splicing (u.a. Exon-Inklusion oder Exon-Skipping) nuklärem mRNA Export, die Einflussnahme auf die ribosomale Translation und schließlich auch der co- und posttranslationalen Proteinmodifikation (z.B. Phosphorylierung oder Ubiquitinierung) sowie teils des Proteinspleißens⁴⁶ auf. In diesem Umfang freigegeben erfolgen nun vielfältig-modulare Protein-Protein-Interaktionen der interkonnektierenden Signalkaskaden bis zur Zelloberfläche, deren Rezeptoren.

3. TAL1

Zurückgehend zur Ebene der TF konnten über die Untersuchung von Chromosomenveränderungen bei hämatologischen Erkrankungen in der Vergangenheit zahlreiche wichtige Proteine erkannt werden^{47,48}, die vor allem in Zellproliferation und Differenzierung involviert sind (Protoonkogene). So finden sich bei T-Zell-Neoplasien häufig Fusionsgene aus einer regulatorischen Sequenz des T-Zell-Rezeptorgens (TCR) auf Chromosom 14q11 (Alpha Locus), Chromosom 7q34 (Beta Locus) oder Gamma-Locus (7p14-15) und Protoonkogenen. Dafür stellt der Prozess der somatischen Rekombination (V(D)J-Rekombination) über Recombination Activating Gene 1 bzw. 2,

(RAG1, RAG2) in der T- und B-Zellreifung ein Einfallstor dar⁴⁹. 1988 entdeckten Begley et al. durch Analyse des TCR-Breakpoints auf Chromosom 14 die Translokation t(1;14)(p33;q11) in Blasten eines an einer Akuten T-Zellleukämie (T-ALL) verstorbenen Kindes⁵⁰. Sie bezeichneten das auf Chromosom 1 beteiligte Gen als Stem Cell Leukemia (SCL, heute TAL1) und charakterisierten es nachfolgend als bHLH-Protein⁵¹. Aus t(1;14)(p33;q11) folgt die TAL1-Kontrolle durch regulative Elemente des für die TCR δ -Kette kodierenden Gens und infolgedessen eine ektopische bzw. neo-konstitutive Expression⁵². Neben der t(1;14) werden auch TAL1-Translokationen mit Chromosom 7 (q34) und 3 (p21) beobachtet⁵². Aufgrund von flankierenden Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) bzw. kryptischen, RSS-ähnlichen Sequenzen werden hier vermutlich Fehler der V(D)J-Rekombinase kausal^{49,50,53}.

3.1. Klinische Signifikanz

Die Gen- und Promotorstruktur von TAL1 ist durch Translokationen oder - wesentlich häufiger - submikroskopischen Deletionen (mit dem Resultat der SIL-TAL1-Fusion) in 20-30% der T-ALL verändert⁵⁴⁻⁵⁸. Zusätzlich findet sich - vermutlich durch Mutationen in höher gelegenen Signalwegen - eine gesteigerte TAL1-Expression bei etwa 60% der pädiatrischen und ca. 45% der adulten T-ALL^{59,60}. Zudem handelt es sich bei TAL1 um einen in der Hämatopoese unverzichtbaren TF. Murine TAL1 -/- Embryos sind schon in der frühen Embryonalperiode (E8,5 bis E10,5) aufgrund des vollständigen Fehlens aller Blutzellen nicht mehr überlebensfähig⁶¹⁻⁶³. Weiterhin spielt der TF in der adulten Megakaryopoese und Erythropoese eine wichtige Rolle⁶⁴. Die Identifikation von neuen TAL1-Zielgenen ist dementsprechend sowohl aus klinischen Gründen, als auch zum Verständnis der hämatopoetischen Funktionen bedeutsam.

3.2. Expression

TAL1 lässt sich pränatal immunhistochemisch vor allem in der Hämatopoese (beginnend mit den Blutinseln, Leber, Milz) sowie Elementen des ZNS (Neuralrohr, später im Rückenmark), des Skelettsystems (Osteoklasten, Knochen, Knorpel) und im Endothel zahlreicher Organe nachweisen⁶⁵⁻⁶⁷. Postnatal zeigt sich eine TAL1-Expression in multipotenten Vorläuferzellen der myeloiden Linie und weiter entlang den

Differenzierungslinien der Erythropoese⁶⁸⁻⁷¹ sowie der Thrombopoese⁷². Hier wird der TF in der terminalen Zellreifung der Erythrozyten und Megakaryozyten herunterreguliert⁷³. Ferner zeigt sich eine Beteiligung an der Monocytopoese⁷⁴. Auch im Endothel ist postnatal eine fortgesetzte Expression zu beobachten: so kommt es bei der Wundheilung, aber auch in der Onkogenese zur signifikanten Zunahme der TAL1-Expression⁷⁵. Ferner lässt sich der TF in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen wie der Aorta nachweisen⁶⁵. Dementsprechend liegen TAL1s primäre physiologische Funktionen im hämatopoetischen, vaskulären und osteogenen System^{76,77}.

3.3. TAL1-Komplex

TAL1 arbeitet in Multiprotein-Komplexen mit je nach Kontext changierenden Interaktionspartnern (vgl. Abb. 2 und 3). Der erste TAL1-Komplex wurde 1997 mit Bindung an eine E-Box-GATA-Kombination identifiziert⁸⁴. Aufgrund der zuvor erfolgten Erkenntnisse zur DNA-Bindung mit E2A-Produkten^{85,86}, der TAL1-LMO2^{87,88}-, und Ldb1-LMO2-Interaktion⁸⁹ sowie der LMO2-GATA1-Beziehung⁹⁰ konnte nun ein Multiproteinkomplex aus TAL1, E-Protein, LMO2, Ldb1 und GATA1 vorgeschlagen werden⁸⁴.

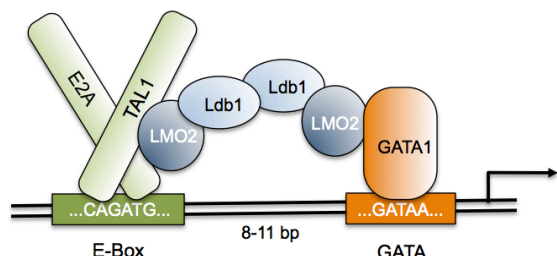


Abb. 2: TAL1-Komplex in erythroiden Zellen nach^{47,91}.

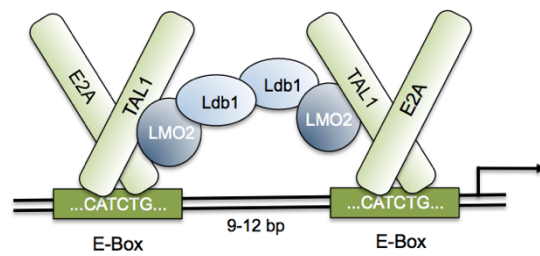


Abb. 3: TAL1-Komplex in leukämischen Zellen nach^{47,91}.

Es wird postuliert, dass TAL1-Komplexe als molekularer "Alles-oder-nichts"-Schalter agieren, indem sie die Anwesenheit sämtlicher Interaktionspartner zur robusten Zielgen-Aktivierung erfordern⁹². Diese geschieht über Bindung der basischen Domäne an die Ephrussi-Box⁹³ (E-Box, CANNTG) oder auch DNA-unabhängig via Dimerisierungen mit anderen (b)HLH-Proteinen. Wie Experimente mit den TAL1-Mutanten ohne DNA-Bindungssequenz zeigten werden zahlreiche Funktionen Komplex-vermittelt ausgeübt^{38,94}. Es wurden mittlerweile zahlreiche weitere Interaktionspartner identifiziert

(vgl. Tab. 2). Dementsprechend ergibt sich eine grosse regulatorische Vielfalt mit Integratorfunktion von TAL1

TF	Co-Aktivatoren	Co-Repressoren
E2A ⁸⁵	BRG1 ⁹⁵	BRG1 ⁹⁵
ERG/FLI-1 ⁹⁶	p300/CBP ¹⁰²	ETO2 ¹⁰⁴
GATA1 ⁹⁰ , GATA2 ⁹⁰ , GATA3 ⁹⁷	LDB1 ⁸⁴	HDAC1 ¹⁰⁵ , HDAC2 ¹⁰⁰
HES ⁴¹	LMO1/2 ⁸⁷	LSD1 ¹⁰⁰
MEIS1 ⁹⁶	PCAF ¹⁰³	mSin3A ¹⁰⁵ , mSin3B ⁴⁷
RUNX1 ⁹⁶	FACT ⁹⁹	MTGR1 ¹⁰⁶
SP1 ⁹⁸	CDK9 ⁹⁹	GF11B ¹⁰⁷
TIF1 γ ⁹⁹		ZHX ⁴¹
CoREST ¹⁰⁰		NCAPG2 ¹⁰⁸
SATB1 ¹⁰¹		SUV39H1 ¹⁰¹

Tab. 2: TAL1-Protein-Interaktionspartner

3.4. Knockout

TAL1 wurde durch Knockout-Experimente als unverzichtbar für die primäre und definitive Hämatopoese erkannt. Murine Tal1 $-/-$ Embryos sind bereits in der frühen Embryonalperiode (Tag E8,5 bis E10,5) aufgrund des vollständigen Fehlens aller Blutzellen nicht mehr überlebensfähig^{61–63}. Beim TAL1-Knockout fehlen durchweg Blutinseln im Dottersack sowie Blut in der dorsalen Aorta. Die murinen Embryos sind - bei ansonsten regelgerecht erscheinender frühen Organogenese - ab Tag E8.75 deutlich wachstumsbeeinträchtigt, blass und aufgeschwollen⁶³. Zudem zeigten konditionale TAL1-Knockouts schwere Defekte in der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems¹⁰⁹. Hier wird die angiogenetische Modifikation des Kapillarnetzes im Dottersack massiv beeinträchtigt, was ebenfalls in einem letalen Phänotyp resultiert. Somit bestehen schwere knockout-bedingte Defekte der primitiven Blut- und Gefäßbildung. Als ursächlich für das Fehlen der kompletten Blutbildung in TAL1 $-/-$ Embryos wird die Notwendigkeit der TAL1-Expression zur Festlegung von Vorläuferzellen des Mesoderms auf das hämatopoetische Differenzierungsprogramm und der Formierung von frühen Progenitorzellen gesehen^{62,110,111}.

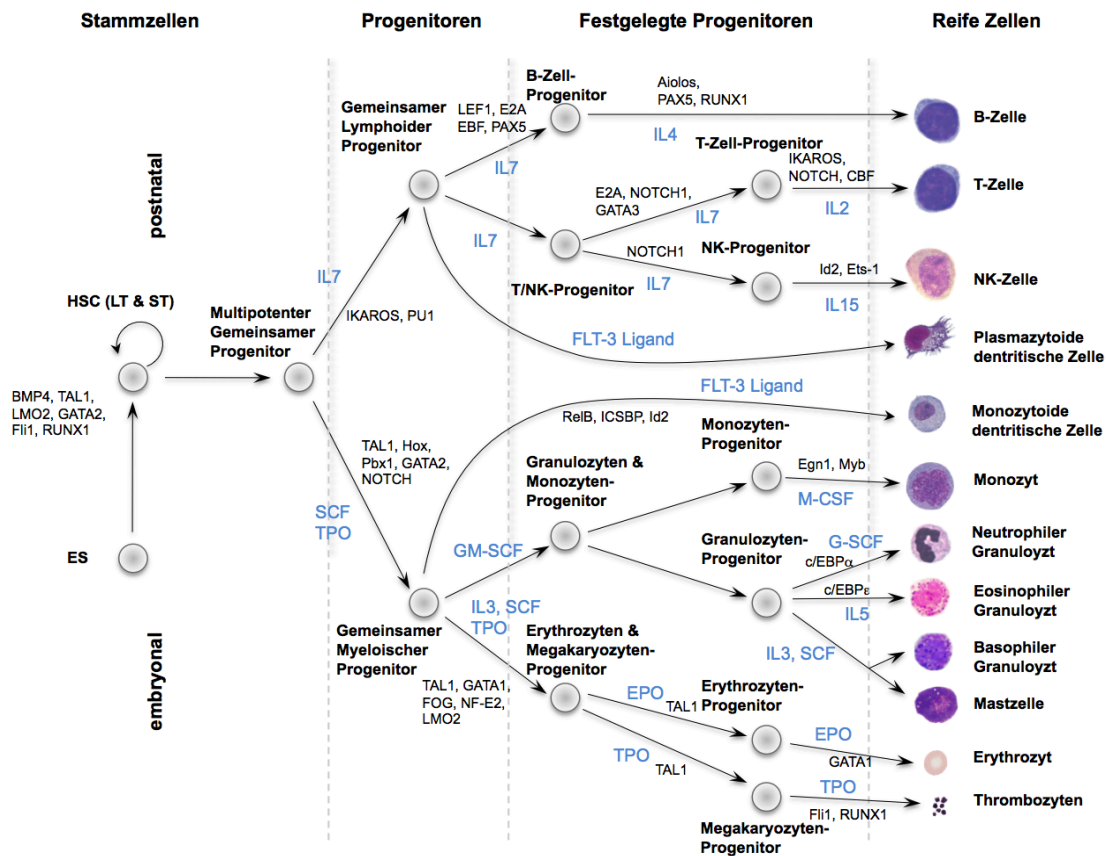


Abb. 4: Klassisches Modell der Hämatopoese
 Zeichnung nach⁷⁸⁻⁸¹. Aus multipotenten HSC entstehen über multiple Differenzierungsschritte gemeinsame Progenitoren der lymphoiden bzw. myeloiden Reihen (CLP, CMP), die sich weiter in die einzelnen Funktionsträger (v.a. Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten) differenzieren.

Dementsprechend fehlen in der Abwesenheit von TAL1 essentielle Startpunkte für nachfolgende Signalkaskaden. Zur Untersuchung des TAL1-Beitrags zu definitiven Hämatopoese wurden chimäre Mäuse mit Beinhaltung von embryonalen TAL1^{-/-} Stammzellen gebildet. Hier zeigte sich, dass die TAL1^{-/-} Zellen zu allen Geweben ausser dem hämatopoetischem System und Milz beitragen¹¹². Zudem ergaben Knockdown via shRNA und quantitative Transplantationsexperimente mit TAL1 haplodefizienten Knochenmarkszellen, dass der Wechsel zwischen ruhendem (G0) und replizierendem Zustand von Langzeit (LT)-Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) TAL1-abhängig vonstattengeht¹¹³. Ebenfalls eine Reduktion aller hämatopoetischen Zellen fanden sich beim shRNA vermittelten TAL1-Knockdown in CD34⁺ Zellen bei Transplantation in Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficient (Non-SCID)-Mäuse: sowohl Short Term (ST)-, als auch LT-HSC trugen nur drastisch reduziert zur Hämatopoese bei¹¹⁴. Dies könnte sich über die TAL1 abhängige Änderung des Expressionsverhalten von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1a/p21)

oder Inhibitor of Differentiation 1 (ID1) erklären¹¹³. Ähnliches zeigt sich bei humanen embryonalen Stammzellen (hESC:) hier verhindert der TAL1-Knockdown die hämatopoetische Spezifizierung⁶⁷. Somit ist TAL1s Rolle auch bei der Differenzierung von HSC zu verorten¹¹⁵. Anhand der Summe dieser Erkenntnisse stellt sich TAL1 als Master-Regulator der Hämatopoese dar (vgl. Abb. 4 und 5).

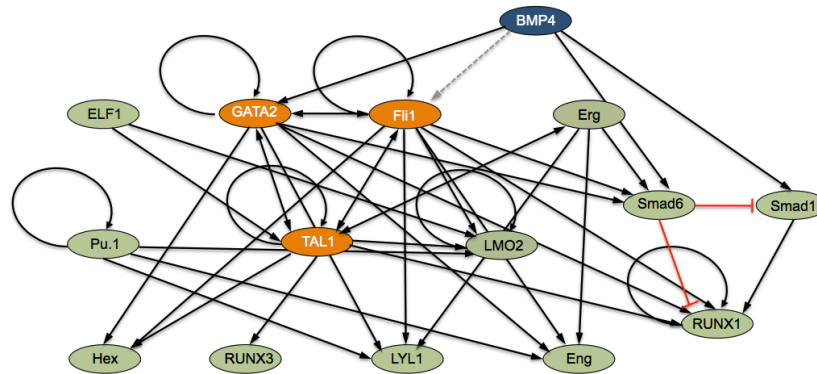


Abb. 5: Genregulatorisches Netzwerk der hämatopoetischen Stammzellen mit der Integration von TAL1, RUNX1 und BMP4. Zeichnung nach^{78,82,83}.

3.5. Überexpression

Die Überexpression von TAL1, GATA1 und LMO2 führt im *Xenopus* zur Herausbildung von hämatopoetischen Zellen aus dem Mesoderm, wohingegen die Überexpression von TAL1 und LMO2 zur Expansion der Blutinseln führen¹¹⁰. Auch in hESC fördert die Überexpression von TAL1 die Herausbildung von hämatoendothelialen Zellen und hämatopoetischen Zellen, ist jedoch alleine nicht in der Lage die komplette hämatopoetische Entwicklung der hESC zu bewirken, so dass hier wahrscheinlich bislang noch unbekannte Master-Regulatoren mitwirken müssen⁶⁷. Wird TAL1 in Mäusen überexprimiert, so kommt es bei den Tieren mit der höchsten nachweisbaren TAL1-Konzentration (mRNA-Spiegel fünffach oberhalb des endogenen Niveaus) zu pathologischen Veränderungen der Knochen, Wachstumsverzögerung, spärlicher Behaarung und Unfruchtbarkeit¹¹⁷. Bei Mäusen mit niedrigem ektopischen TAL1-Spiegel traten diese Veränderungen demgegenüber deutlich seltener oder gar nicht auf¹¹⁷. Hinsichtlich TAL1s Beitrag zur Leukämogenese könnte die bei forcierter TAL1-Expression beobachtete repressive Interaktion mit den E-Boxen im CDKN1a/p21- (reguliert CDK4, die Rb phosphoryliert und so E2F zur Durchführung des Zellzyklus entlässt)- und Pre- T cell receptor α -Chain (pT α)-Promotor miterklärend sein¹¹⁸. Diese

führt einerseits zu verstärkter Proliferation (*Reduktion des Inhibitors p16*), andererseits über die Repression von pT α zur verminderten Expression der prä-TCR alpha-Kette und damit zu verminderter Differenzierung¹¹⁸.

3.6. Erythropoese

Angesichts des wesentlichen Beitrags des TF zur Erythropoese soll diese kurz dargestellt werden. Erythropoese ist die Neubildung von Erythrozyten aus HSC über multiple Progenitorstadien im Knochenmark. Pro Sekunde werden beim Erwachsenen unter Normalbedingungen knapp zwei Millionen Erythrozyten neu synthetisiert¹¹⁹. Im Zuge der Interaktion von Globin-Gen-Locus-Kontrollregionen (LCR) und den Genloci der Seitenketten werden der physiologischen Situation entsprechend (Affinität zu O₂) spezifische Untereinheiten (je zwei α und β -Seitenketten) des Hämoglobin (Hb)-Moleküls gebildet (vgl. Abb. 6). Für α -Globine (HbA Gencluster auf Chr. 16) lauten die Loci: 5': ζ (HbZ)...pseudo- ζ (HbZP1)... μ (HbM)...pseudo- $\alpha 1$ (HbAP1)... $\alpha 2$ (HbA2)... $\alpha 1$ (HbA1)... θ (HbQ1)..3'. β -Globine erfolgt die Regulation der LCR sukzessive von 5' nach 3': ... ϵ ... γ -G... γ -A... δ ... β ... Die primitive Erythropoese in den Blutinseln des Dottersacks nutzt für 50% des Hb-Moleküls in erster Linie embryonales Hb - mit höherer Sauerstoffaffinität als adultes - und wird am Tag 42 p.c. von der Erythrozyten-Produktion in der Leber (fetales Hämoglobin A γ und G γ abgelöst)¹²⁰. Kurz vor der Geburt erfolgt dann ein erneuter Wechsel auf das adulte HbA ($\alpha 2\beta 2$, ein geringer Anteil von fetalem Hb wird weitergebildet). An der Expression und dem Wechsel der β -Globin-Subtypen sowie am Aufrechterhalten der außergewöhnlich hohen Transkriptionsraten sind besonders die Globin-LCR, für die Alphaketten (HbA-LCR) in der MCS-R1 und MCS-R2 des NPRL3-Gens gelegen, für Betaketten (HbB-LCR) ein 5-25 kb 5' des ϵ -Genlocus gelegenes Regulationselement) beteiligt. Bei der Regulation beider Globin-LCR spielt ein TAL1-Komplex eine entscheidende Rolle¹²¹⁻¹²⁸.

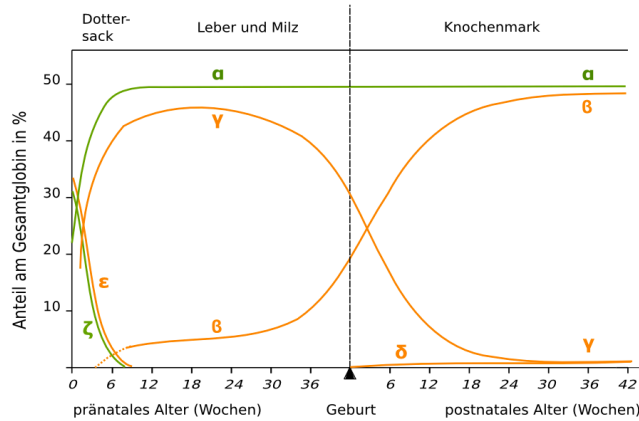


Abb. 6: Erythropoese
 Altersabhängige Produktion von Hämoglobin-Seitenketten nach¹²⁷.
 Grün: α-Globin-ähnlich, orange: β-Globin-ähnlich.

3.7. Bisherige Erkenntnisse zur Onkogenese durch TAL1

Aufgrund einer ektopen TAL1-Expression bei Leukämien können aktivierende oder repressive TAL1-Komplexe entstehen, die im folgenden leukemogen wirken. Hierzu ist jedoch grundsätzlich ein zweiter „Hit“ in einem Komplexpartner bzw. beteiligten Signalweg notwendig. Eine alleinige Überexpression der kompletten für TAL1 kodierenden Region in Knochenmarkszellen der Maus verursachte keine Leukämie (keine Veränderung von Hämatokrit, Leukozytenzahl, Differentialblutbild und Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe)¹²⁹. Auch transgene TAL1-Mäuse (TAL1 und CD2-Enhancer mit SRα Virus-Promotor) entwickelten keine Leukämien¹³⁰. Demgegenüber führt die Infektion von Abelson murine leukemia viral oncogene (v-ABL) transformierten T-Lymphozyten mit einem TAL1-Retrovirus zu einer um 50% erhöhten Letalität aufgrund disseminierter lymphoider Tumore¹²⁹. In ähnlicher Weise wirkt eine Co-Expression von TAL1 zusammen mit Casein Kinase IIα (CK IIα)¹³¹. CKIIα phosphoryliert E2A, worauf keine E2A-Homodimer DNA-Bindung mehr möglich ist¹³². Zu Untersuchung der Interdependenz von multiplen Proteinen des TAL1-Komplexes wurde TAL1 in Form der SIL-TAL1-Fusions-DNA unter dem SIL-Promotor in Mäusen ektopisch exprimiert¹¹⁷. Von diesen transgenen SIL-TAL1-positiven Mäusen entwickelte allerdings nur 1/180 (0,005%) im Verlauf der Beobachtungszeit von 16 Monaten eine T-Zell-Neoplasie. Dieses Bild änderte sich mit gleichzeitiger ektopischer LMO1-Expression drastisch. TAL1+ (SCL+ ((SIL-TAL1)/LMO1+))-Mäuse entwickelten zwischen dem Alter von 10 und 22 Wochen zu >95% aggressive T-Zell-Leukämien oder T-Zell-Lymphome (vgl. Abb. 7)¹¹⁷. Allerdings kann auch eine alleinige TAL1-

Expression in einer T-ALL enden - vermutlich bedingt durch Inhibition hemmender E-Proteine¹¹⁵.

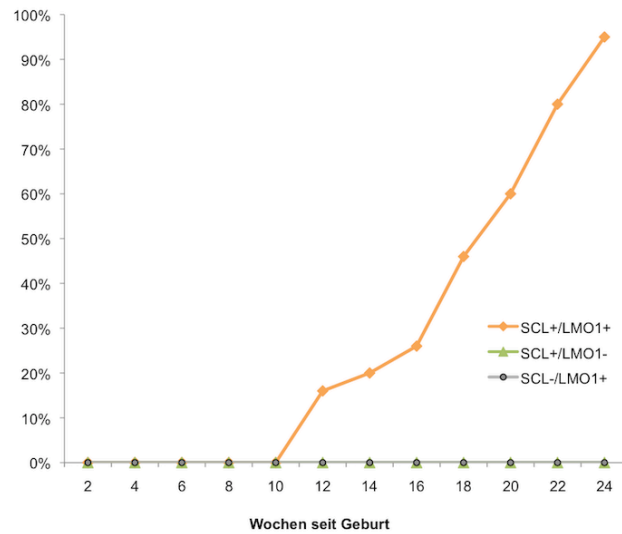


Abb. 7: Kumulative Inzidenz von Leukämien und Lymphomen bei SCL/LMO1-Mäusen

Die erforderliche Netzwerkveränderung mehrerer Elemente/Gene ist im Einklang mit der Multiple-Hit-Hypothese der Entwicklung von malignen Neoplasien (vgl. Einleitung). Infolge der Expression zweier Komplex-Partner wirkt TAL1 wahrscheinlich über eine Id-artige-Funktionsweise inhibierend¹¹⁷. Dies scheint über eine dominant-repressive Interaktion mit E2A-Zielgenen vonstatten zu gehen¹³³. Hieraus lässt sich z.B. die repressive Wirkung auf den pTα-Promotor (*Differenzierungsblock*) und in Verbindung mit der AD die aktivierende auf den des p16-Gens (*Proliferationssteigerung*) erklären¹¹⁸. Ferner induziert TAL1 die Überexpression des anti-apoptotischen Gens BCL2A1⁶⁰.

3.8. Virale Assoziationen

Im Zuge der Epstein Bar-Virus (EBV)-Infektion kommt es in B-Zellen zur Hochregulierung von TAL1, dagegen nimmt die Konzentration von E2A ab¹³⁴. Ebenso steigt bei der Simian Vacuolating Virus 40 (SV40)-Infektion von Ito-Zellen in Abhängigkeit des SV40 Large T Antigens (SV40 T-Ag) die TAL1-Expression¹³⁵. Das u.a. in einigen Regionen Afrikas, Südamerikas, der Karibik, Japans und australischen Aborigines-Gebieten endemische Retrovirus Humanes T-Lymphotropes Virus-1 (HTLV-1) codiert für das nukleäre Phosphoprotein Transactivator encoded by the X region (Tax), das bei ca. 5% der Infizierten eine T-ALL auslöst¹³⁶. Tax induziert u.a. den TF TAL1, der

im Feedback die Aktivität des HTLV-1 Promotors über Bindung an E-Boxen hochreguliert^{137,138}.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien und Geräte

Verwendete Geräte und Chemikalien sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt:

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Ampicillin	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	München
Ethanol, 100%	Carl Roth	Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA Labs	Pasching
L-Glutamin	PAA Labs	Pasching
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Metafectene	Biontex	München
Penicillin/Streptomycin	PAA Labs	Pasching
Protaminsulfat	Sigma Aldrich	München
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	ThermoFisher	Waltham
SYBR Green-Mix	Eurogentec	Köln

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav HST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer	Tuttlingen
Durchflusszytometer/-sorter FACSAria	BD Biosciences	Heidelberg
Falkon-Zentrifuge Universal 320R	Hettich	Tuttlingen
Gefrierschrank -80°C	Hettich	Tuttlingen
Light Cycler 480	Roche	Mannheim
Mikroskop Diavert	Leitz	Wetzlar
NanoDrop 1000	ThermoFisher	Waltham
PCR-Thermocycler Primus 96	PeqLab	Erlangen
Sterilbank CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Waage EMB 600-2	Kern & Sohn	Balingen
Zellkultur-Brutschrank Cellstar	Nunc	Wiesbaden

Tab. 4: Verwendete Geräte

4.2. DNA-/RNA-Methoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wie Anzucht und Transformation von Bakterien zur DNA-Vermehrung, Herstellung kompetenter Zellen, Gelelektrophorese, Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), Ligations-Reaktionen und Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analysen wurden - sofern nicht anders angeben - nach Sambrook et al. 2012 durchgeführt¹³⁹. DNA-Aufreinigung (Miniprep), DNA-Aufreinigung aus Gelen sowie RNA-Isolation wurden mit entsprechenden Kits (vgl. Tab. 5) nach den jeweiligen Angaben des Herstellers durchgeführt.

Kit	Anwendung	Hersteller/Ort
GeneJET Plasmid Miniprep	Aufreinigung von Plasmid-DNA	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneJET PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneJET Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	Aufreinigung von RNA	Qiagen, Hilden
Omniscript RT Kit	Umschreiben von RNA in cDNA	Qiagen, Hilden

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Kits

4.2.1. Quantitative real-time PCR

Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration durch quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde nach Ernte der Zellen und RNA-Isolation (RNeasy Mini-Kit) entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) 1 µg RNA via Omniscript-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden Random-Hexamer-Primer von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Für den qPCR-Ansatz wurden anschliessend 23 µl H₂O, je ein 1 µl Forward (FWD)-Primer bzw. Reverse (REV)-Primer (je 10 pmol/µl) und 25 µl SYBR Green-Mix (Eurogentec, Köln, Deutschland) vermischt und zu 48 µl des qPCR-Ansatzes 2 µl cDNA gegeben. Je 24 µl des Ansatzes (Doppelbestimmung) wurden in eine 96well-qPCR-Platte (#GK480K-BC, Kisker, Steinfurt, Deutschland) pipettiert. Die qPCR wurde im LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) mit folgendem qPCR-Programm (Tab. 6) und Primern (Tab. 7) durchgeführt:

#	Schritt	Temp. °C	Zeit	Zyklen
1.	Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
2.	Denaturierung	95	60 s	
3.	Primer-Annealing/Messung	57	30 s	50x
4.	DNA-Synthese	72	30 s	
5.	Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	1 x

Tab. 6: qPCR-Programm

Die Bestimmung der mRNA-Konzentration erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode¹⁴⁰ mit Normalisierung auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die relative Genexpression wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen berechnet, indem deren mRNA-Expression auf 1 gesetzt wurde.

mRNA	Orientierung	Sequenz	TM (°C)
hTAL1	FWD	ACCACCAACAATCGAGTGAAG	57,9
	REV	GATCTCATTCTTGCTGAGCTT	55,9
hGAPDH	FWD	GAGTCAACGGATTTGGTCGTATT	58,9
	REV	GAATTTGCCATGGGTGGAAT	55,2

Tab. 7: Verwendete Primer

4.2.2. Lentivirale Vektorklonierung

Zur lentiviralen Transduktion mammaler Zellen für einen TAL1-Knockdown wurde zunächst der SEW-Vektor¹⁴¹ (entwickelt zur lentiviralen Transduktion von Monozyten) auf Selektion in Säugetierzellen angepasst, indem die GFP-Zeo-Kassette aus dem psiRNA-h7SK-GFPZeo-Vektor (vgl. Abb. 8) inklusive CMV-HTLV-Promotor eingefügt wurde. Anschliessend wurde eine small hairpin (sh) TAL1-Sequenz ligiert (modifizierter Vektor, vgl. Abb. 9). Diese wurde zuvor seitens Dr. Nadine Courtial mittels siRNAWizard (Invivogen) entworfen. Eine nichtspezifische shRNA (shLacZ) wurde als Kontrolle benutzt. Eine shRNA ermöglicht die Verhinderung der Zielgen-Expression mittels RNA-Interferenz. Letztlich bildet die shRNA eine microRNA nach, die von den Enzymen Drosha und Dicer prozessiert und über den RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) die Translation der Ziel-mRNA verhindert.

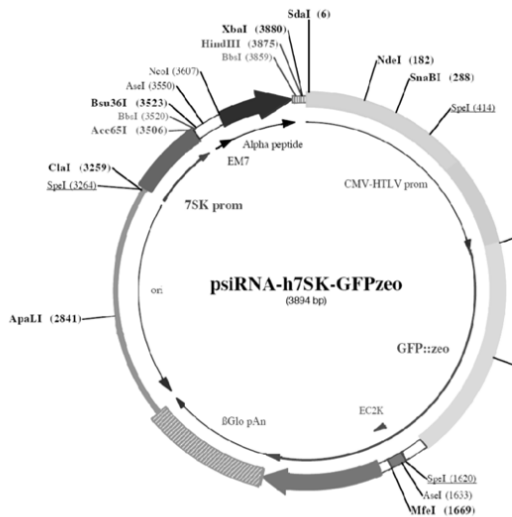


Abb. 8: Vektor
psiRNA-h7SK-GFPzeo
Ausschneiden der Segmente: CMV-HTLV-
Promotor und GFP-Zeo

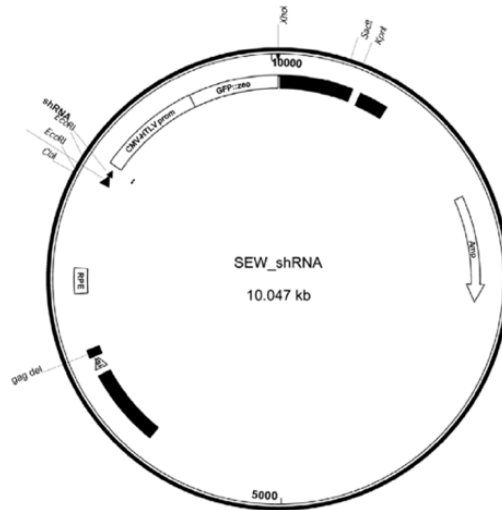


Abb. 9: Modifizierter Vektor
SEW_shRNA
Es erfolgte das Anpassen des shRNA-Vektors
auf Säugerzellen durch Einsetzen des Segments
CMV-HTLV-Promotor und GFP-Zeo über
Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI
und XhoI, Ligation der betreffenden shRNA-
Sequenz.

Name	Oligonukleotid
shTAL1	5'-GACAAGAAGCTCAGCAAGAAT-3' 5'-AAAGTTGTGCGGCGTATCTTC-3'
shLacZ	5'-GACAAGAACTAAGCAAGAAT-3'

Tab. 8: Knockdown Oligonukleotide

4.3. Zellbiologische Methoden

4.3.1. K562-Zellen

Aufgrund einer prominenten TAL1-Expression wurden K562-Zellen Untersuchungsgegenstand. K562 entstammen einer 53-jährigen Chronischen Myeloischen Leukämie (CML)-Patientin in der Blastenkrise¹⁴². Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. RPMI-1640 (ThermoFisher, Waltham, UK) wurde als Medium verwendet; dieses war mit 10 % fetalem Kälberserum (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland), sowie 2 mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) versetzt.

4.3.2. Herstellung lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel wurden von Dr. Nadine Courtial in 293T-Zellen über das 3-Plasmid-System hergestellt. Hierzu wurden 24h vor der Transfektion 293T-Zellen in einer Dichte von $3 \cdot 10^6$ in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Nachfolgend 3,5 µg Env-Plasmid (pMDG2-VSV-G), 6,5 µg Core-packaging-Plasmid (pCMVdelta8_91) und 10 µg SEW mit 10 µl Metafectene® (Biontex, München, Deutschland) in 200 µl serumfreiem DMEM (Gibco, Darmstadt, Deutschland) gemischt, 20 min inkubiert und auf die Zellen gegeben. Die lentiviralen Partikel wurden nach 24-96h aus dem Zellkulturüberstand gesammelt und zur Steigerung der Transduktionseffizienz durch Ultrazentrifugation (UZ) aufkonzentriert.

4.3.3. Transduktion von K562-Zellen

Für die Transduktion wurden K562-Zellen mit einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ /Well in einer 24well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden 200 µl der konzentrierten lentiviralen Partikel zusammen mit 10 µl Protaminsulfat auf die Zellen pipettiert und die Platte bei 2000 rpm und 30°C für 60 Minuten zentrifugiert. Nach 24h wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und zur Weiterkultivierung in RPMI-1640 (Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland) resuspendiert.

4.3.4. Anreicherung lentiviraler Partikel

Nach 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen erneut unter o.g. Bedingungen pelletiert. Das Pellet wurde in 2000 µl PBS/2 % BSA aufgenommen, zur Vereinzelung filtriert (30µm Filter) und in FACS-Röhrchen überführt. An einem FACSAria (BD, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen schliesslich anhand des GFP-Signals sortiert. Dies wurde freundlicherweise von Herrn Tefik Merovci durchgeführt (AG Dr. Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Die positiven Zellen wurden nachfolgend erneut unter o.g. Bedingungen pelletiert und für 24h in Kultur genommen, daran schloss sich die RNA-Extraktion an (vgl. Tabelle 3).

4.4. RNA-Sequenzierung

Nach TAL1-Knockdown erfolgte auf Basis der FACS-gesorteten K562-Zellen jeweils zweier unterschiedlicher Knockdown-Experimente shTAL1 und shLacZ nach RNA-Extraktion eine Transkriptomanalyse (mRNAseq) unter Nutzung der Illumina-Hochdurchsatzmethode („Sequenzierung mit Brückensynthese“) der jeweiligen Replikate A und B sowie aus A und B gepooltem Sample C (shTAL1_A, shTAL1_B, pool_shTAL1_C; shLacZ_A, shLacZ_B, pool_shLacZ_C).

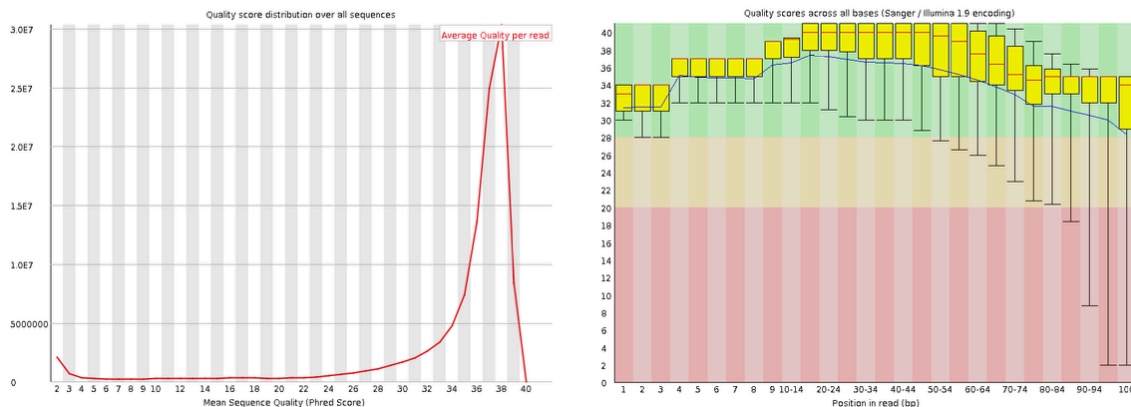
4.4.1. Herstellung der Sequenzierungsbibliotheken

Die Qualität der via RNeasy Mini-Kit extrahierten RNA wurde auf einem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einem RNA Nano Series II Chip (Agilent, Waldbronn, Deutschland) überprüft und zeigte mit einer RNA Index-Nummer von 10 bei allen Proben keine Anzeichen der Degradierung. Aus der Gesamt-RNA wurden entsprechend des TruSeq RNAseq-Protokolls (Illumina, San Diego, USA) Sequenzierungsbibliotheken erstellt. Es erfolgten zwei mRNA-Aufreinigungsschritte mit polyA-Beads. Die Grösse und Konzentration der Sequenzierungsbibliotheken wurde mit einem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) bestimmt und die Konzentration auf 8 pM eingestellt. Entsprechend der ENCODE-Empfehlungen zur Durchführung einer RNAseq wurden pro biologisches Replikat mehr als 100 Millionen Fragmente sequenziert (im Durchschnitt 166 Millionen/Replikat). Insgesamt ergab die RNAseq eine Milliarde Sequenzierungsfragmente (2x 100 bp, paired-end) aus 4 Reihen einer HiSeq2000 Fliesszelle (Illumina, San Diego, USA) mit einem TruSeq PE Cluster v3-cBot-HS-Kit und einem TruSeq SBS-v3-H-Kit (Illumina, San Diego, USA). Die Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken und Sequenzierung erfolgte durch Dr. Olivier Armand (NGS Facility, Karlsruhe Institute of Technology, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland).

4.4.2. Bioinformatik

Die bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte nach Trapnell et al¹⁴³ und ist in Abb. 14 dargestellt (sogenannte „Pipeline“ einer Programm-Abfolge).

Zusammengefasst wurden die Sequenzfragmente von Knockdown TAL1 vs. Kontrolle (Knockdown LacZ) zunächst via FASTQC¹⁴⁴ qualitätskontrolliert (vgl. Abb. 10),



*Abb. 10: Analyse der Readqualität
Dargestellt ist das Ergebnis der Qualitätsanalyse der Sequenzierung (Read 1-100)
mit dem Programm FASTQC.*

über TopHat mit dem Referenzgenom (GRCh37) abgeglichen, mit Cufflinks annotierten Transkripten zugeordnet (Abb. 11) und über Cuffmerge und Cuffdiff schliesslich Expressionsunterschiede analysiert (Abb. 12). Die verwendeten Befehle lauteten für Tophat und Cufflinks (Darstellung an einem Read-Paar, Tal1A_R1 und R2):

```

1  #!/bin/bash
2  #SBATCH --ntasks=2
3  #SBATCH --cpus-per-task=10
4  #SBATCH --error=tophat_err.log
5  #SBATCH --output=tophat_out.log
6  #SBATCH --job-name=tophat
7  #SBATCH --mem-per-cpu=3200
8  #SBATCH --partition=parallel
9  #SBATCH --time=4-00:00:00
10 #SBATCH --mail-type=ALL
11 #SBATCH --mail-user=B.Koch@med.uni-frankfurt.de
12 #
13 export OMP_NUM_THREADS=10
14
15 srun tophat -p 10 -G genes.gtf -o Tal1A_thout genome Tal1A_R1.fastq Tal1A_R2.fastq
16 srun cufflinks -p 10 -G genes.gtf -o Tal1A_clout Tal1A_thout/accepted_hits.bam
17

```

*Abb. 11: Tophat und Cufflinks-Befehle
für den Universitäts-Cluster LOEWE-CSC. #SBATCH bezeichnet die Informationen für den
Workload-Manager SLURM (u.a. Anzahl der CPU, RAM, Laufzeit, Prozesszahl), auf "srun"
folgen die jeweiligen Befehle von TopHat (Abgleich der Reads mit dem Referenzgenom) bzw.
Cufflinks (Zuordnung zu annotierten Transkripten).*

Sowie für Cuffmerge und Cuffdiff:

```

1
2  srun cuffmerge -g genes.gtf -s genome.fa -p 10 assemblies.txt
3  srun cuffdiff -o diff_out -b genome.fa -p 8 -L lacz,Tal1 -u ./
4  merged_asm/merged.gtf ./lacz_A_thout/accepted_hits.bam,./lacz_B_thout/
5  accepted_hits.bam,./lacz_C_thout/accepted_hits.bam,./Tal1_A_thout/
6  accepted_hits.bam,./Tal1_B_thout/accepted_hits.bam,./Tal1_C_thout/
7  accepted_hits.bam
8

```

*Abb. 12: Verwendete Befehle für Cuffmerge und Cuffdiff
(Vereinigung der Datensätze über Cuffmerge und Analyse von Expressionsunterschieden via
Cuffdiff).*

Zur Selektion von Genen mit TAL1-Bindung im Promotorbereich (TSS +/- 3000 bp) wurden ENCODE-ChIPseq-Daten aus K562 (Michael Snyder, Accession# ENCSR000EHB, <https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR000EHB>, <https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR000EHM/>) über HOMER mit >2-fach veränderten Genen abgeglichen (Abb. 13).

```
1 annotatePeaks.pl Tal1K562.txt hg19 -gene TAL1KD.txt > outputTal1K562_exp.txt
```

Abb. 13: Befehl zur Annotation der TAL1-ChIPseq Peaks in Relation zu den Knockdown-Ergebnissen. Verwendet wurde das Programm HOMER; in der Datei Tal1K562.txt sind die ChIPseq-Peaks mit den Genom-Koordinaten niedergelegt, in der Datei TAL1KD.txt die nach TAL1-Knockdown expressionsveränderten Gene.

So gelang die Identifizierung von tatsächlich expressionsveränderten TAL1-Zielgenen in K562-Zellen in Unterscheidung zum bisherigen Erkenntnisstand der bloßen Präsenz des TF an regulatorischen Elementen (ENCODE ChIPseq in K562, s.o.).

Anschließend erfolgte eine Analyse nach Gen Ontologie (GO)-Termen. GO ist Teil der Open Biomedical Ontologies Initiative des U.S. National Centers for Biomedical Ontology (NCBO), das sich zum Ziel gesetzt hat ein einheitliches Vokabular in Biomedizin und Biologie zu entwickeln. Zusätzlich werden durch GO Gene und Genprodukte entsprechend dem aktuellen Kenntnisstand der Funktion in einer Datenbank annotiert und Programme zur GO-Nutzung geschaffen. GO stellt drei Bereiche dar in denen gefragt wird: zu welcher „zellulären Komponente“ gehört das Gen? An welchem „biologischen Prozess“ ist es beteiligt? Was für eine „molekulare Funktion“ hat es inne? Hierzu wurden die aus der Analyse resultierenden Genlisten via DAVID¹⁴⁵, BLAST2GO¹⁴⁶, HOMER-Functional Gene Enrichment (<http://analysis3.bxgenomics.com/bxgenomics/tools/homer.php>) und der ToppGeneSuite¹⁴⁷ (jeweils mit Standardeinstellungen der Version 2018) auf signifikant vertretene GO-Terme untersucht sowie nach herab- bzw. hochregulierten Genen und den assoziierten GO-Termen nach biologischen Prozessen, zellulären Komponenten, molekularer Funktion und dominanten Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG¹⁴⁸)-Signalwegen strukturiert.

Ferner wurden die >2-fach veränderten lncRNA über das Genomdatenbank-Projekt ENSEMBL¹⁴⁹ zusammen mit der TAL1-ENCODE-ChIPseq (vgl. oben) dargestellt und in Relation zu den benachbarten Genen annotiert. Die Zuordnung der lncRNA erfolgte über die Annotation von noncode.org (NONCODE v4)¹⁵⁰. Noncode.org ist eine

Datenbank der chinesischen Akademie der Wissenschaften zur Integration des aktuellen Wissensstands aller ncRNA (mit Ausnahme von transfer- und ribosomaler RNA). Als neue TAL1-Zielgene wurden solche ohne PubMed-Treffer (Suche „TAL1 OR SCL + Zielgen-Name“) bezeichnet.

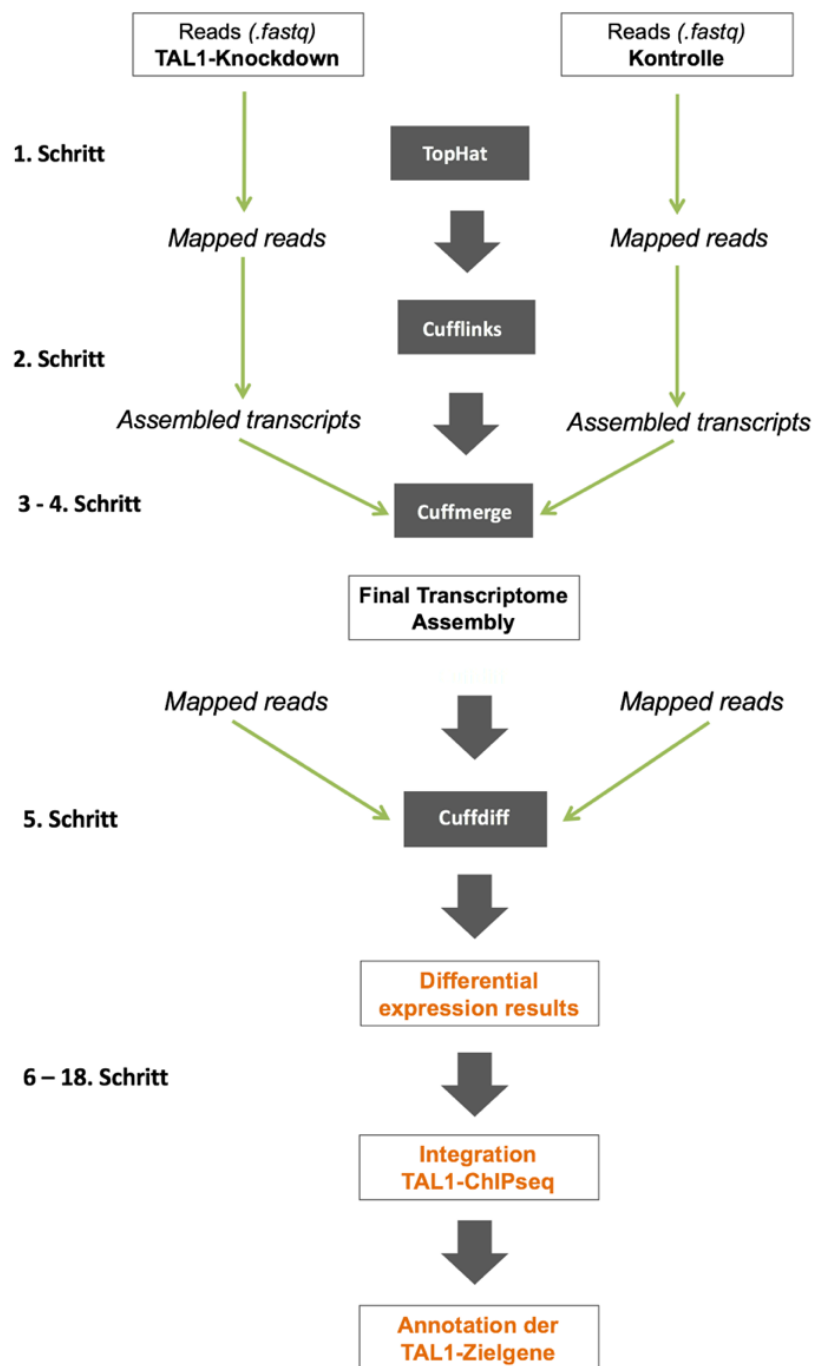


Abb. 14: "Pipeline" der RNaseq-Auswertung
 Die Sequenzierungsergebnisse („Reads“) aus dem Knockdown TAL1 (*shTAL1*) und Kontrolle (*shLacZ*) wurden mit den Programmen der Tuxedo-Suite (TopHat, Cufflinks, Cuffmerge, Cuffdiff) bearbeitet und zur Identifikation von Zielgenen in Bezug zu einer TAL1-ChIPseq in K562 gesetzt.

5. Ergebnisse

5.1. Signifikant expressionsveränderte Transkripte

Nach TAL1-Knockdown in K562-Zellen (vgl. Abb. 16) zeigten sich 3205 signifikant (p - und q -Wert $<0,05$) veränderte codierende Transkripte (vgl. Tab. 9 und 10) sowie 5136 signifikant veränderte lncRNA. Die Darstellung der Signifikanz erfolgte im Volcano-Plot (vgl. Abb. 15), die der Probenverteilung in der Hauptkomponenten-Analyse, die zahlreiche signifikant und in Kontrolle bzw. Knockdown beieinanderliegende Proben zeigte. Anschließend wurden die Transkripte nach GO-Termen geordnet, zur Zielgen-Identifizierung nach TAL1-Bindung im Promoterbereich gefiltert und auf mindestens 2-fache Expressionsveränderungen reduziert.

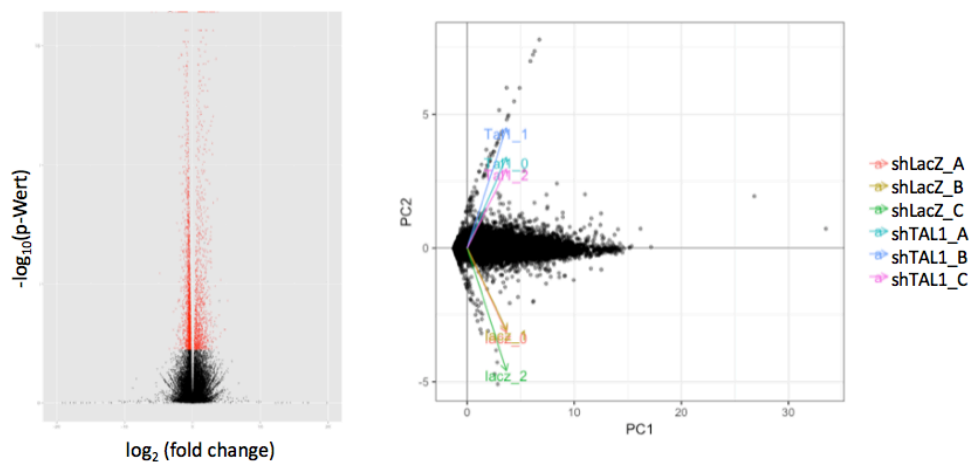


Abb. 15: Volcano-Plot und Hauptkomponenten Analyse

Signifikant veränderte Transkripte sind im Volcano-Plot (\log_2 (fold change) gegen \log_{10} (p -Wert)) dargestellt, die Verteilung der Proben im Datenraum in der Hauptkomponenten-Analyse (PCA).

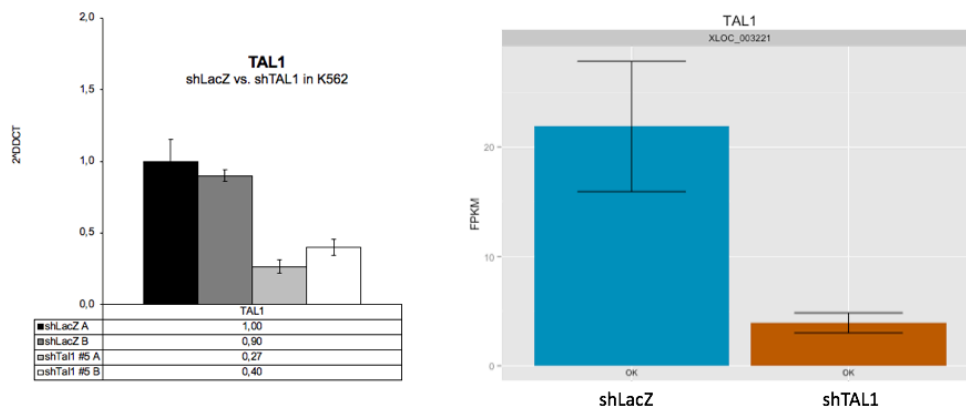


Abb. 16: Kontrolle der Knockdown-Effizienz
TAL1 real-time PCR (li.) vs. RNAseq (re.)

5.1.1. Top 40 herunterregulierte codierende Transkripte

Ensembl ID	Gen	Locus	FC	p-Wert	q-Wert
ENSG00000244398	RP11-466H18.1	11:16799841-17074583	-13,43	0,000	0,002
ENSG00000230629	RPS23P8	X:70182813-70183143	-13,05	0,000	0,002
ENSG00000162367	TAL1	1:47681962-47697892	-11,36	0,000	0,002
ENSG00000164076	CAMKV	3:49895420-49907655	-9,45	0,000	0,009
ENSG00000229119	CTB-63M22.1	5:165809309-165809604	-8,54	0,000	0,002
ENSG00000223802	CERS1	19:18979360-19007536	-7,76	0,001	0,024
ENSG00000212802	RPL15P3	6:12514341-12515006	-6,54	0,000	0,002
ENSG00000235552	RPL6P27	18:6462142-6463014	-6,17	0,000	0,002
ENSG00000235552	RP11-572P18.1	10:122114176-122114718	-6,13	0,000	0,002
ENSG00000215030	RPL13P12	17:17286690-17287326	-5,90	0,000	0,002
ENSG00000188985	DHFRP1	18:23713815-23773319	-5,80	0,000	0,002
ENSG00000137970	RP11-122C9.1	1:97144429-97145176	-5,80	0,000	0,002
ENSG00000228589	RP5-1053E7.1	1:28421581-28422933	-5,73	0,000	0,002
ENSG00000242071	RPL7AP6	14:70320847-70499083	-5,39	0,000	0,002
ENSG00000177144	NUDT4P1	1:145139024-145139569	-5,37	0,000	0,004
ENSG00000184216	IRAK1	X:153275950-153285440	-5,35	0,001	0,036
ENSG00000100351	GRAP2	22:40297085-40369725	-5,29	0,000	0,002
ENSG00000154380	ENAH	1:225677501-225840844	-4,97	0,000	0,002
ENSG00000172974	AC007318.5	2:65432136-65433396	-4,92	0,000	0,002
ENSG00000168661	ZNF30	19:35417806-35436074	-4,90	0,000	0,009
ENSG00000232024	LSM12P1	8:35092974-35654068	-4,77	0,000	0,002
ENSG00000172889	EGFL7	9:139543061-139567130	-4,64	0,000	0,002
ENSG00000198756	GLT25D2	1:183898795-184006863	-4,64	0,000	0,014
ENSG00000174938	SEZ6L2	16:29882479-29910868	-4,60	0,000	0,002
ENSG00000224631	RP11-51O6.1	16:61089302-61089868	-4,54	0,000	0,002
ENSG00000124098	FAM210B	20:54933970-54943719	-4,52	0,000	0,002
ENSG00000241506	PSMC1P1	3:68684855-68686175	-4,50	0,000	0,002
ENSG00000249936	RAC1P2	4:46725792-46726625	-4,45	0,000	0,002
ENSG00000198406	BZW1P2	3:115528640-117716439	-4,44	0,000	0,002
ENSG00000128692	EIF2S2P4	2:171579718-171627276	-4,36	0,000	0,002
ENSG00000095203	EPB41L4B	9:111934254-112083244	-4,28	0,000	0,002
ENSG00000168135	KCNJ4	22:38820292-38851205	-4,20	0,001	0,020
ENSG00000072041	SLC6A15	12:85253491-85307394	-4,19	0,000	0,002
ENSG00000240489	SETP14	3:155705092-155705965	-4,19	0,000	0,004
ENSG00000231991	ANXA2P2	9:33624222-33625532	-4,19	0,000	0,002
ENSG00000168754	FAM178B	2:97541619-97684341	-3,90	0,000	0,002
ENSG00000153885	KCTD15	19:34286837-34306666	-3,90	0,000	0,002
ENSG00000157870	FAM213B	1:2517929-2718286	-3,70	0,000	0,011
ENSG00000156206	C15orf26	15:81299373-81441516	-3,70	0,000	0,002
ENSG00000122863	CHST3	10:73724122-73773322	-3,70	0,000	0,002

Tab. 9: Top 40 herunterregulierte codierende Transkripte

5.1.2. Top 40 hochregulierte codierende Transkripte

Ensembl ID	Gen	Locus	FC	p-Wert	q-Wert
ENSG00000227507	LTB	6:31548301-31550299	14,30	0,000	0,002
ENSG00000135346	CGA	6:87795215-87804824	14,27	0,000	0,002
ENSG00000100628	ASB2	14:94400498-94443137	11,41	0,000	0,015
ENSG00000117676	RPS6KA1	1:26856251-26901521	11,31	0,001	0,023
ENSG00000186810	CXCR3	X:70835765-70838367	11,10	0,000	0,007
ENSG00000172824	CES4A	16:67022491-67043661	10,82	0,000	0,002
ENSG00000108405	P2RX1	17:3799885-3819794	10,14	0,000	0,002
ENSG00000138835	RGS3	9:116207010-116360018	10,00	0,000	0,009
ENSG00000211829	TRDC	14:22849082-22951948	9,47	0,000	0,002
ENSG00000180644	PRF1	10:72357103-72362531	9,31	0,000	0,002
ENSG00000100427	MLC1	22:50497819-50524331	9,12	0,000	0,002
ENSG00000266222	RP11-433M22.2	17:46537731-46543402	9,09	0,000	0,002
ENSG00000170476	MZB1	5:138723168-138725770	9,01	0,000	0,002
ENSG00000134061	CD180	5:66478102-66492627	8,23	0,000	0,002
ENSG00000100385	IL2RB	22:37521877-37595425	7,91	0,000	0,002
ENSG00000147443	DOK2	8:21766383-21771371	7,80	0,000	0,004
ENSG00000257378	RP11-469H8.8	12:50344523-50359434	7,65	0,001	0,019
ENSG00000164484	TMEM200A	6:130686878-130764208	7,59	0,000	0,002
ENSG00000117091	CD48	1:160639937-160681641	7,43	0,000	0,002
ENSG00000185198	PRSS57	19:685545-695460	7,40	0,000	0,002
ENSG00000204475	NCR3	6:31553900-31560762	7,31	0,000	0,002
ENSG00000121858	TNFSF10	3:172223297-172241297	7,11	0,000	0,002
ENSG00000117090	SLAMF1	1:160577889-160617085	6,75	0,000	0,002
ENSG00000171101	SIGLEC17P	19:51645555-51685222	6,46	0,000	0,002
ENSG00000143839	REN	1:204123943-204135465	6,46	0,000	0,002
ENSG00000183484	GPR132	14:105515727-105531782	6,42	0,000	0,011
ENSG00000167941	SOST	17:41831098-41836156	6,32	0,000	0,006
ENSG00000154252	GAL3ST2	2:242716239-242743623	6,31	0,001	0,019
ENSG00000227619	RP11-492E3.2	9:132337687-132346835	6,08	0,000	0,002
ENSG00000171136	RLN3	19:14138959-14142369	6,05	0,000	0,002
ENSG00000132965	ALOX5AP	13:31309644-31338556	6,04	0,000	0,002
ENSG00000079308	TNS1	2:218664511-218867718	6,01	0,000	0,002
ENSG00000198796	ALPK2	18:56148478-56296189	5,95	0,000	0,002
ENSG00000235641	LINC00484	9:93881343-93945044	5,93	0,000	0,004
ENSG00000229694	GOLGA8S	15:23599992-23610281	5,86	0,001	0,036
ENSG00000261739	GIPR	19:46171501-46186982	5,85	0,000	0,002
ENSG00000010310	BIRC3	11:102188214-102210134	5,82	0,000	0,002
ENSG00000023445	HFE	6:26087508-26098571	5,75	0,000	0,002
ENSG00000010704	TNFRSF18	1:1138887-1142071	5,70	0,001	0,022
ENSG00000186891	CYSLTR1	X:77526960-77583048	5,62	0,000	0,002

Tab. 10: Top 40 hochregulierte codierende Transkripte

5.1.3. Reduktion auf >2-FC und TAL1-Bindung im TSS-Bereich

Über Einbindung einer TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (Michael Snyder, Accession# ENCSR000EHB, <https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR000EHB>) liess sich bei 71 codierenden und 416 lncRNA-Genen mit mindestens 2-facher Genexpressionsveränderung eine TAL1-Bindung im Bereich der TSS-Region (-3 kb, TSS, + 3 kb) nachweisen. Aufgrund zahlreicher Gen-Isoformen mit unterschiedlicher TSS wurde in Korrelation mit Ensembl-Taten (Track: Regulatory Elements) eine Erweiterung der bislang teils noch üblichen Bezugnahme auf das komplette Gen durchgeführt.

Auswahlkriterien codierende Transkripte	Anzahl
p, q < 0,05	3205
≥ 2-facher Foldchange	842
+ TAL1-Bindung -3000 bp TSS + 3000 bp (inkl. Isoformen TSS)	71

Tab. 11: Anzahl der codierenden Transkripte

>2-fach expressionsveränderte codierende Transkripte mit TAL1-Bindung in der TSS

Gen	FC	p-Wert	q-Wert	Abstand zur TSS	Peak Score	Annotation
PLEC	2,4	0,000	0,002	-2842	1000	intron (NM_000445, intron 2 of 32)
LYZ	2,1	0,000	0,002	-2446	429	Intergenic
IL23A	2,1	0,000	0,002	-2349	238	Intergenic
TOB2P1	3,1	0,001	0,016	-2014	175	Intergenic
UBE2F	-2,2	0,000	0,002	-1896	659	intron (NR_037904, intron 4 of 18)
ADAM8	2,9	0,000	0,002	-1837	165	intron (NM_001164490, intron 1 of 19)
PTPRVP	3	0,000	0,012	-1815	1000	Intergenic
CEBPE	-2,2	0,000	0,002	-1737	1000	Intergenic
TBC1D10A	2,2	0,000	0,015	-1715	371	intron (NM_001204240, intron 1 of 8)
RARRES3	2,8	0,000	0,002	-1697	167	Intergenic
GFI1B	-2,2	0,000	0,014	-1688	1000	Intergenic
BCL3	3,1	0,000	0,002	-1492	537	intron (NM_005178, intron 2 of 8)
TCF7	-2,1	0,000	0,002	-1447	242	intron (NM_213648, intron 3 of 7)
TPI1P2	2,4	0,000	0,002	-1236	202	Intergenic
IL1RL1	4,9	0,000	0,002	-1196	1000	intron (NM_001282408, intron 1 of 6)
PPBP	2,6	0,000	0,002	-1007	249	Intergenic
ITGB7	4,1	0,000	0,002	-1003	1000	intron (NM_000889, intron 1 of 15)
SLC2A1	-2,1	0,000	0,002	-918	397	promoter-TSS (NM_006516)

TLR5	2,1	0,001	0,020	-764	189	promoter-TSS (NM_003268)
C11orf21	2,9	0,000	0,002	-748	1000	promoter-TSS (NR_138249)
TAL1	-	0,000	0,002	-664	867	Intergenic
MYL4	-2,6	0,000	0,002	-606	1000	intron (NM_002476, intron 2 of 6)
BMF	5,6	0,001	0,025	-570	662	Intergenic
FCER2	3,9	0,000	0,002	-541	1000	promoter-TSS (NM_001207019)
FAM213B	-3,7	0,000	0,011	-532	1000	promoter-TSS (NM_001195736)
POU3F2	-3,1	0,000	0,002	-476	809	promoter-TSS (NM_005604)
LTBP3	2,6	0,000	0,002	-416	225	promoter-TSS (NM_001130144)
ERMAP	-2,1	0,000	0,007	-365	570	intron (NM_001017922, intron 4 of 11)
HMBS	-2,2	0,000	0,004	-350	1000	intron (NM_001258209, intron 1 of 12)
CPXM1	-2,9	0,000	0,002	-303	1000	promoter-TSS (NM_019609)
MYC	-2,1	0,000	0,002	-284	706	TTS (NM_002467)
MIR4732	-3,1	0,000	0,002	-272	204	promoter-TSS (NR_029970)
ZNF320	-2,6	0,000	0,006	-259	382	promoter-TSS (NM_207333)
GRAP2	-5,3	0,000	0,002	-258	763	intron (NM_001291824, intron 5 of 7)
SOST	6,3	0,000	0,006	-244	201	promoter-TSS (NM_025237)
HBZ	-2,1	0,000	0,002	-180	172	promoter-TSS (NM_005332)
CLCA1	2,2	0,000	0,002	-161	190	promoter-TSS (NM_001285)
ABCA7	2,5	0,001	0,034	-132	1000	intron (NM_019112, intron 1 of 46)
RAB3IL1	-2,8	0,000	0,002	-130	199	intron (NM_001271686, intron 1 of 8)
PLVAP	-3,4	0,000	0,004	-122	748	promoter-TSS (NM_031310)
TMEM64	-2,1	0,000	0,002	-110	165	promoter-TSS (NM_001008495)
RLN3	6	0,000	0,002	-99	671	promoter-TSS (NM_001311197)
EGFL7	-4,6	0,000	0,002	-86	1000	promoter-TSS (NR_045111)
PKLR	-3,1	0,001	0,027	-62	785	promoter-TSS (NM_000298)
SH2D2A	2,3	0,000	0,002	-46	183	promoter-TSS (NM_003975)
LINC00520	-2,1	0,000	0,002	-10	164	promoter-TSS (NR_026796)
DLX1	-2,3	0,000	0,002	-2	147	promoter-TSS (NM_178120)
FUCA1	2,8	0,000	0,002	2	151	intron (NM_000147, intron 1 of 7)
IER3	2,1	0,000	0,002	16	185	promoter-TSS (NM_003897).4
IER5L	2,2	0,000	0,002	52	325	promoter-TSS (NM_203434)
LGALS3	2,5	0,000	0,002	92	145	promoter-TSS (NR_003225)
PLA2G16	2,8	0,000	0,002	93	947	promoter-TSS (NM_007069)
WSB1	2,2	0,000	0,002	103	189	promoter-TSS (NR_039748)
DNAJB2	2,8	0,000	0,002	232	1000	intron (NM_006736, intron 1 of 8)
GBP2	2,5	0,000	0,002	254	300	exon (NM_004120, exon 2 of 11)
FAM83A	-2,6	0,000	0,002	292	1000	5' UTR (NM_207006, exon 2 of 6)
FRK	2,2	0,000	0,002	378	713	5' UTR (NM_002031, exon 1 of 8)
CMTM6	2,2	0,000	0,002	533	573	intron (NM_017801, intron 1 of 3)
BCL2A1	3,2	0,000	0,002	735	171	Intergenic
BTG2	2,3	0,000	0,002	823	1000	Intergenic
PTGS1	2,3	0,000	0,002	863	226	Intergenic
PBXIP1	3,3	0,000	0,002	895	229	intron (NM_020524, intron 1 of 10)
NR4A2	4,5	0,000	0,002	1096	141	Intergenic
NT5M	-2,1	0,001	0,019	1281	1000	intron (NM_020201, intron 1 of 4)
KLF15	-2,1	0,000	0,002	1324	457	intron (NM_014079, intron 1 of 2)
HEMGN	-3,6	0,000	0,002	1435	1000	intron (NM_018437, intron 1 of 4)

ATG16L2	2,2	0,001	0,034	1462	183	intron (NM_033388, intron 1 of 17)
YPEL3	2,6	0,000	0,002	1548	141	intron (NM_031477, intron 3 of 3)
HEPACAM2	-2,7	0,000	0,002	1701	298	intron (NM_001346642, intron 2 of 9)
VBP1	-2,9	0,000	0,002	2612	1000	intron (NM_001303545, intron 1 of 5)
TANK	2,6	0,000	0,002	6341	1000	intron (NM_001199135, intron 1 of 7)

Tab. 12: mindestens 2-fach veränderte Transkripte mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich

5.2. GO/KEGG/Co-Expressionsanalysen

Mehr als zweifach veränderte Gene wurden nach den o.g. Methoden auf signifikant vertretene Terme untersucht sowie nach herab- bzw. hochregulierten Genen, Co-Expression, assoziierten biologischen Prozessen, zellulären Komponenten, molekularer Funktion und dominanten KEGG-Signalwegen strukturiert.

5.2.1. Codierende Transkripte

5.2.1.1. Herunterregulierte codierende Transkripte

Nach Knockdown zeigte sich mit herunterregulierter Genexpression in der Co-Expressionsanalyse besonders signifikant Leukämie- und Stammzellgene (Abb. 17). In der GO-Analyse steht aufgeschlüsselt nach biologischen Prozessen an erster Stelle die Regulation des Sauerstofftransports (Abb. 18, 20, 22), nach zellulären Komponenten der Hämoglobin-Komplex (Abb. 19), nach repräsentierten KEGG-Termen Infektionserkrankungen und das Wnt-Signalling (Abb. 21).

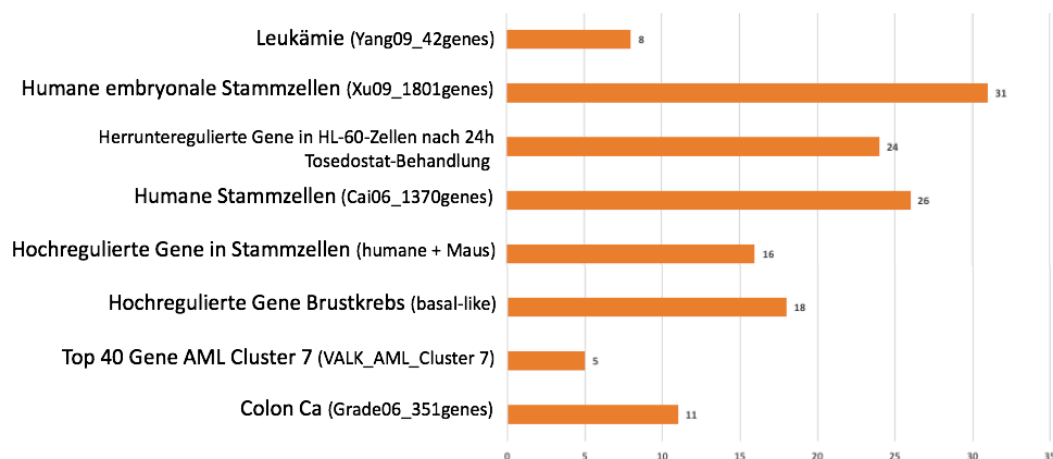


Abb. 17: Coexpressions-Analyse nach TAL1-Knockdown

Transkripte mit einer mehr als zweifachen Expressionsveränderung (p und $q < 0,05$) wurden in der ToppGene Suite (unter Beibehalt der Standardparameter) auf Co-Expression in bestehenden Genlisten analysiert. Die Anordnung ist mit niedrigstem p -Wert an der Spitze, die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown-Datensatz pro Genliste.

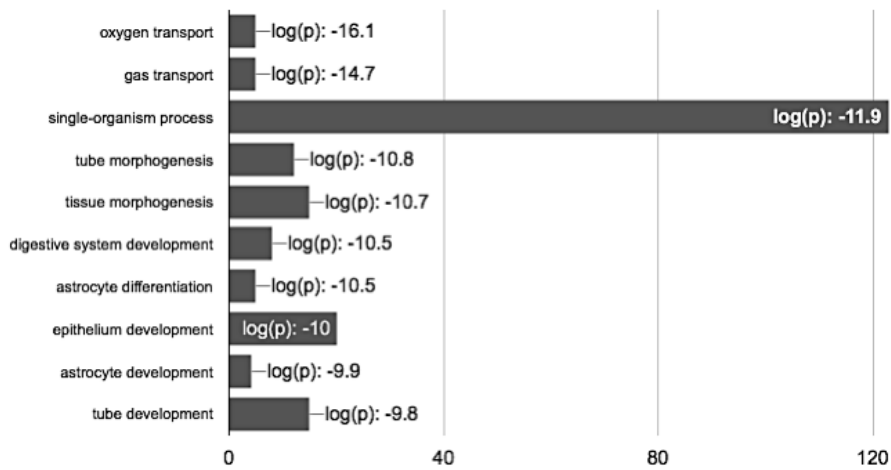


Abb. 18: Herabregulierte Gene & Beteiligung an biologischen Prozessen (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p -Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

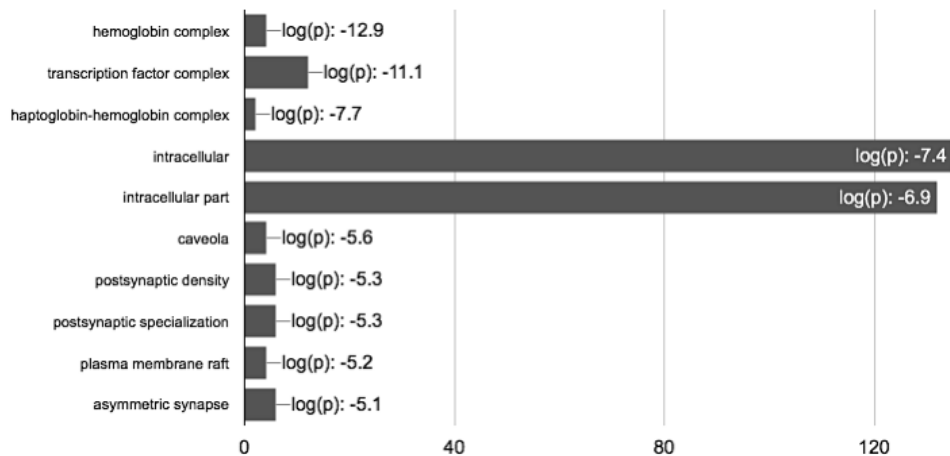


Abb. 19: Herabregulierte Gene & betroffene Zellstrukturen (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p -Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

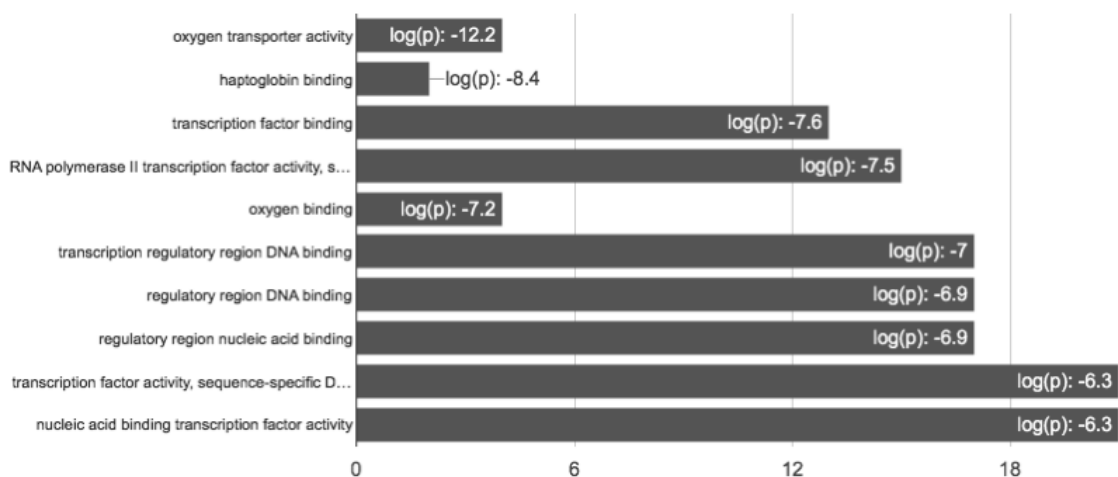


Abb. 20: Herabregulierte Gene & Funktionszuordnung (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p -Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

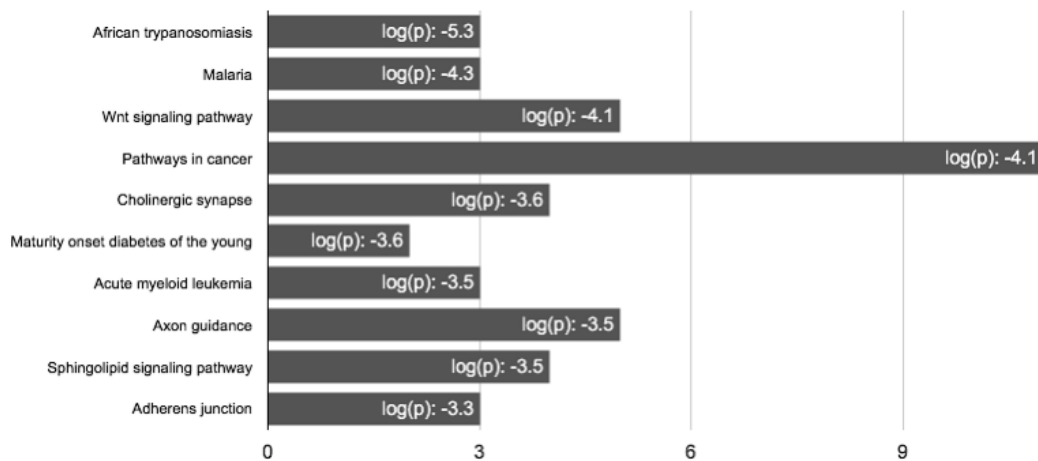


Abb. 21: Herabregulierte Gene & KEGG-Signalwegsanalyse (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p -Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

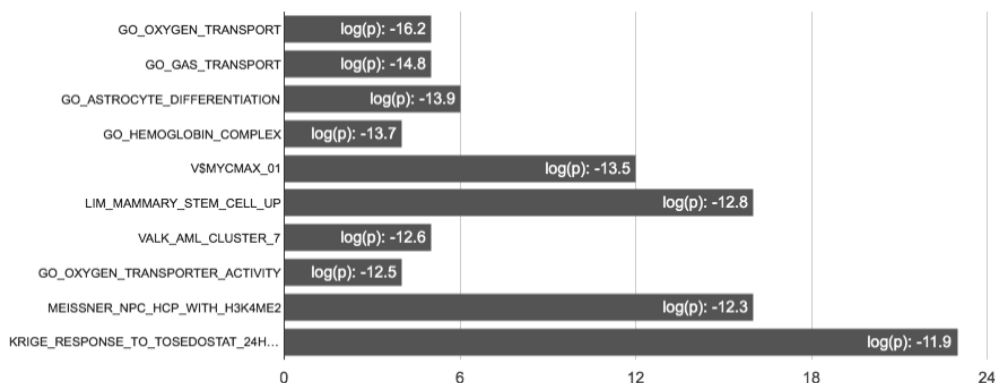


Abb. 22: Herabregulierte Gene nach molekularer Signatur (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p -Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

Die in den Co-Expressions- bzw. GO-Analysen enthaltenen TAL1-Zielgene werden nun vorgestellt:

5.2.1.1.1. GO/Co-Expressionsanalyse Leukämie

5.2.1.1.1.1. GRAP2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei GRB2 related adaptor protein 2 (GRAP2, auch GADS genannt) eine -5,3-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform 003 dar (Abb. 23). GRAP2 ist ein Adaptermolekül im TCR/CD3-Signalweg; es verbindet Lymphocyte cytosolic protein 2 (LCP2) mit Linker for activation of T cells (LAT). Nach TCR-Aktivierung wird GRAP2 zu LAT rekrutiert¹⁵¹. Bei vorliegendem Philadelphia-

Chromosom, d.h. der Präsenz des onkogenen Fusionsprodukts BCR-ABL bindet GRAP2 an BCR-ABL und ist so an der Entwicklung von lymphoiden Leukämien beteiligt³⁴⁷.

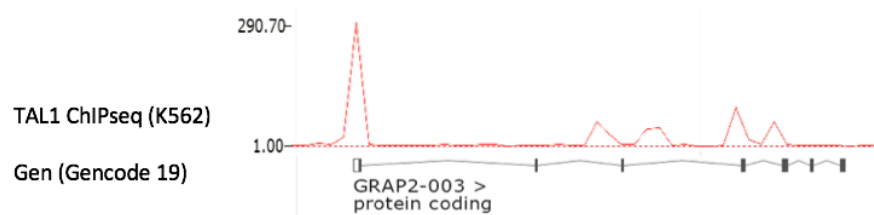


Abb. 23: Zielgen GRAP2

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.2. HEMGN

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Hemogen (HEMGN, auch Erythroid differentiation-associated gene, EDAG genannt) eine -3,6-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellen sich sehr prominente Peaks im Bereich der bislang alleinig bekannten Isoform 001 dar (Abb. 24). Der Vergleich zu bekannten cDNA (Ensembl Genome Browser, Version GRCh37) legt nahe, dass weitere Isoformen existieren, so dass beide prominenten Peaks dann in einem TSS-Bereich zu verorten wären. HEMGN wird spezifisch in hämatopoetischen-, CD34+ sowie in K562-Zellen exprimiert und ist an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt¹⁵². In der AML-Zelllinie HL-60 führt die Überexpression zur Blockierung der TPA-induzierten Differenzierung in Monozyten/Makrophagen; der Knockdown in K562 schränkt das Wachstum ein und verstärkt die Differenzierung zu Erythrozyten¹⁵³, gleiches gilt hinsichtlich der Proliferation in HEL-Zellen¹⁵⁴. Über die Aktivierung von NF- κ B wird zudem Apoptose verhindert¹⁵³. In CD34+ führt die Überexpression zum raschen Eintritt in den Zellzyklus, verhindert die Apoptose und verstärkt ihre Expansion¹⁵⁵. Die Expression von HEMGN ist mit dem Therapieansprechen bei AML assoziiert¹⁵².

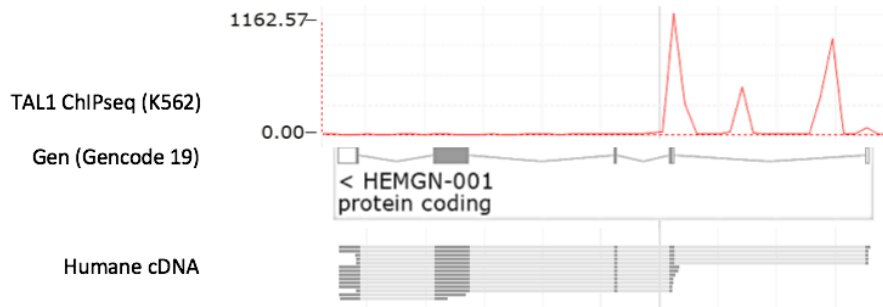


Abb. 24: Zielgen HEMGN

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot), das Zielgen in der Gencode 19-Annotation sowie humane cDNA (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.3. Hämoglobin A-Locus

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich im Hämoglobin A-Locus bei HBA1 eine -3,5-fache, bei HBA2 eine -2,9-fache-, bei HBG1 eine -2,7-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen zeigen sich Peaks vor HBZ und im Bereich von HBA1 (Abb. 25). HBA1 codiert für das adulte Hämoglobin.

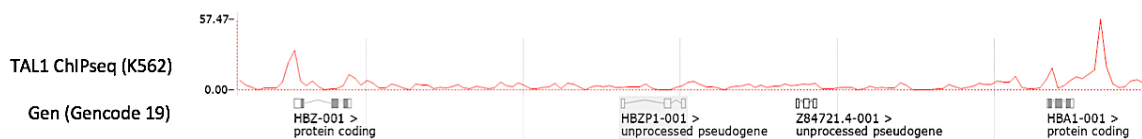


Abb. 25: Zielgene im HBA-Locus

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.4. PKLR

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Pyruvate kinase, liver and red blood cell (PKLR) eine -3,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich von allen bekannten Isoformen dar (Abb. 26). PKLR codiert für eine leber- und erythrozytenspezifische Isoform der Pyruvatkinase, die als letzten Schritt der Glykolyse die Transphospholyierung von Phosphoenolpyruvat zu Adenosindiphosphat katalysiert. Als Produkt folgt hieraus ATP und Pyruvat. Während der Erythropoese kommt es zu einem Isoformenwechsel von der proliferationsassoziierten¹⁵⁶ Pyruvatkinase M2 (PKM2) zu PKLR^{157,158}. Mutationen im PKLR-Gen führen zu einer hämolytischen Anämie¹⁵⁹.

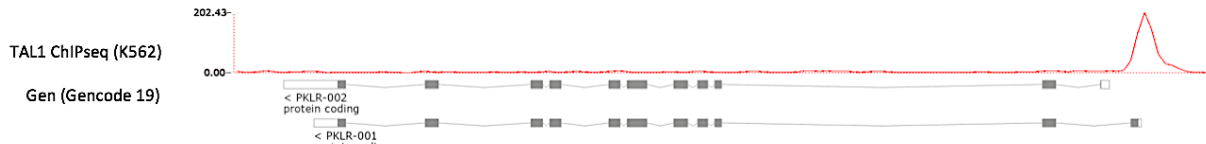


Abb. 26: Zielgen PKLR
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.5. HMBS

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei der Hydroxymethylbilane synthase (HMBS) eine -2,2-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellen sich prominente Peaks vor den Isoformen 008 bis 020 dar (Abb. 27). Die HMBS katalysiert den dritten Schritt der Hämsynthese, bei dem vier Moleküle Porphobilinogen zu Hydroxymethylbilan verbunden werden.

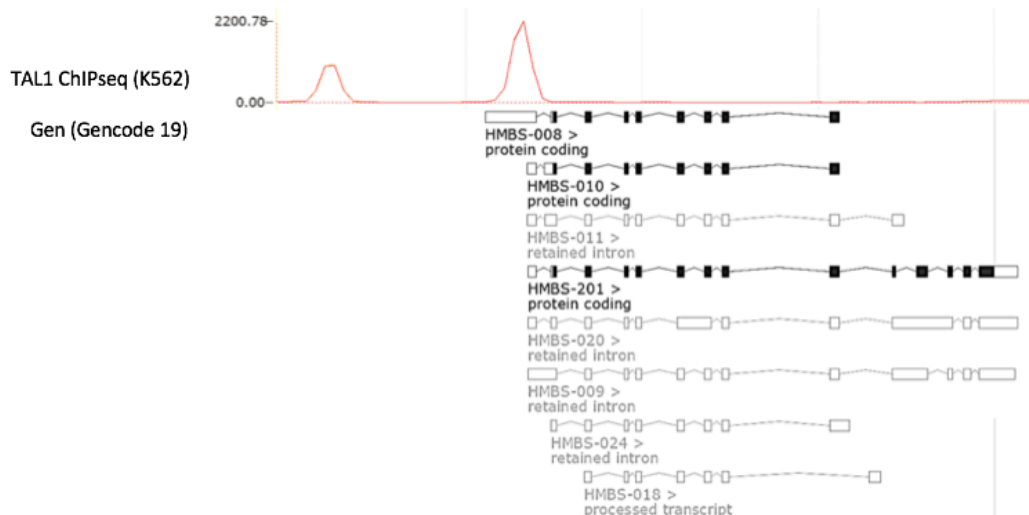


Abb. 27: Zielgen HMBS
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.6. AHI1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Abelson helper integration site 1 (AHI1) eine -2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein deutlicher Peak im Promotorbereich der Isoform 017 dar (Abb. 28). AHI1 codiert für eine Untereinheit des Basalkörpers der eukaryotischen Primärzilie¹⁶⁰, kann aber auch als Onkogen wirken. Eine hohe Expression zeigt sich in BCR/ABL-positiven CML-Stamm-

/Progenitorzellen¹⁶¹. In K562 interagiert AHI1 mit BCR/ABL, führt bei Überexpression zu verstärkter bzw. bei Knockdown zu verminderter Proliferation und kann die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib zusammen mit IL3 komplett aufheben¹⁶².

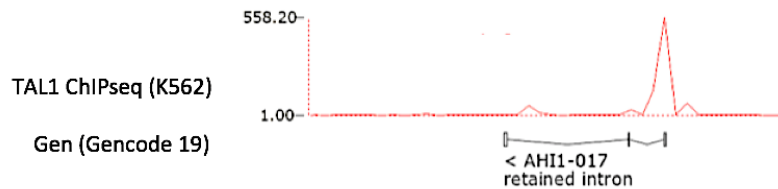


Abb. 28: Zielgen AHI

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.7. TCF7

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Transcription factor 7 (TCF7) eine -2,1-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 008, 009 und 023 dar (Abb. 29). TCF7 wurde auf der Suche nach Regulatoren der CD3E-Aktivität identifiziert und ist essentiell für die T-Zellentwicklung. Bei Überexpression in Knochenmarkszellen führt er ohne eigentlich notwendige Notch1-Signale zur Entwicklung von T-Zellen¹⁶³.

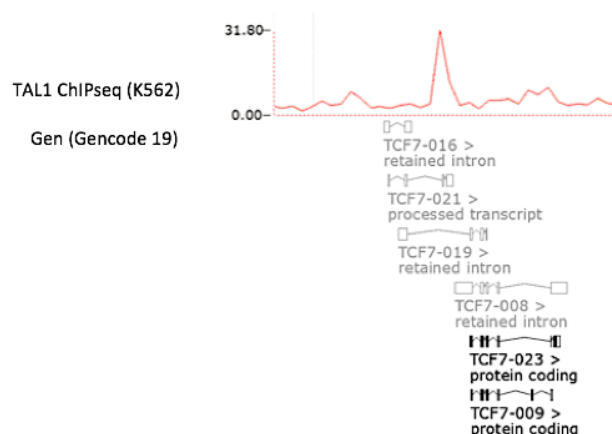


Abb. 29: Zielgen TCF7

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.8. MYC

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC) eine -2,1-fache Expressionsveränderung. In der TAL1-ChIPseq in

K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 001, 004 und 005 dar (Abb. 30). MYC ist wie TAL1 ein bHLH-TF, der als wichtiges Protoonkogen durch Aktivierung und Repression zahlreicher Zielgene u.a. Proliferation, Apoptose, Metabolismus und Stammzell-Selbsterneuerung reguliert und mit deregulierter Expression bei mehr als 50% aller Tumor-Entitäten vorhanden ist¹⁶⁴. MYC wird in therapieresistenten Leukämiezellen stark exprimiert, erhöht deren Proliferation und verhindert ihre Differenzierung¹⁶⁵.

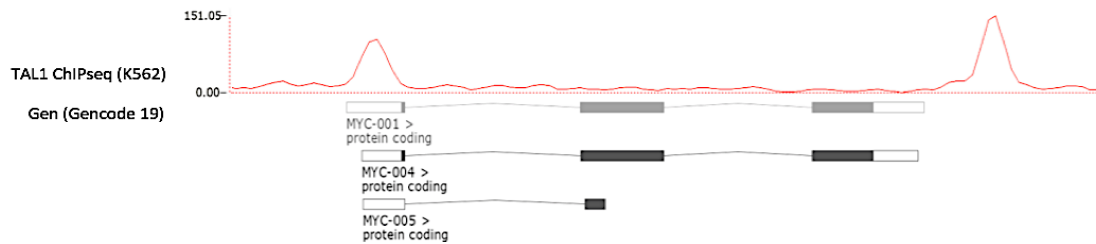


Abb. 30: Zielgen MYC

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.9. GFI1B

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Growth factor independent 1B transcriptional repressor (GFI1B) eine -2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 001 und 002 dar (Abb. 31). GFI1B agiert als transkriptioneller Repressor und spielt zusammen mit CoREST, LSD1 und HDAC1/2 eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese¹⁶⁶. Im Knockout-Experiment der Maus wurde gezeigt, dass GFI1B essentiell für die Erythro- und Megakaryopoese ist: GFI1B ^{-/-} verstarben während des Übergangs von der primitiven zur definitiven Hämatopoese mit Entwicklungsstillstand der Vorläuferzellen¹⁶⁷.

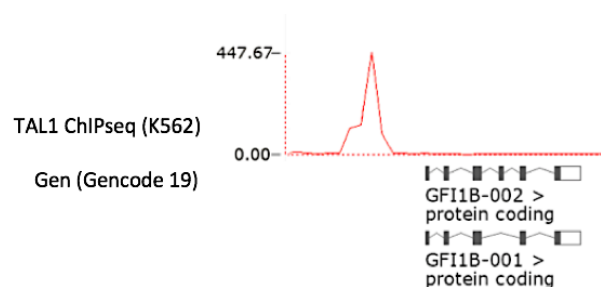


Abb. 31: Zielgen GFI1B

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.10. SLC2A1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1) eine -2,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellen sich prominente Peaks im Promotorbereich aller Isoformen dar (Abb. 32). SLC2A1 codiert für GLUT1 (Alias: Erythrozyten/Hirn-Hexose-Facilitator), den wichtigsten Glukose- und L-Dehydroascorbinsäure-Transporter in u.a. ZNS und Erythrozyten. Letztere weisen die höchste GLUT1-Expression humaner Zellen auf¹⁶⁸.

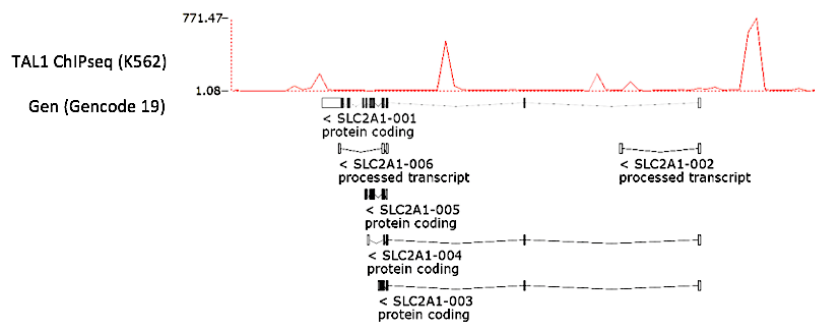


Abb. 32: Zielgen SLC2A1
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.1.11. C11orf21

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Chromosome 11 open reading frame 21 (C11orf21) eine -3,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich aller Isoformen dar (Abb. 33). C11orf21 ist bislang nicht charakterisiert, wurde allerdings in einer genomweiten Assoziierungsstudie mit dem Risiko der Entwicklung einer chronischen lymphozytischen Leukämie assoziiert¹⁶⁹.

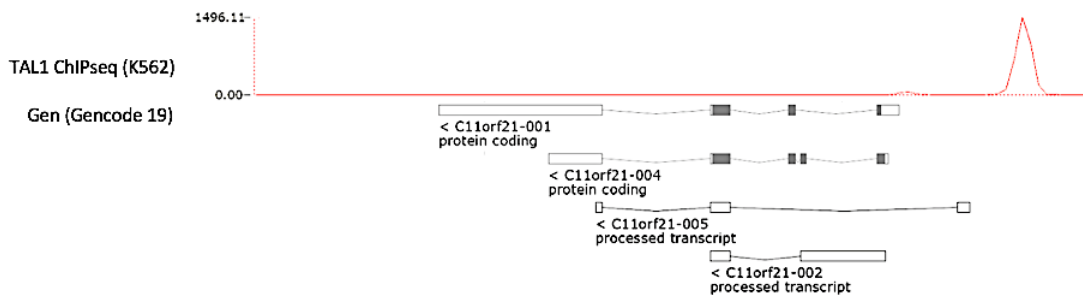


Abb. 33: Zielgen C11orf21
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.2. GO und Co-Expressionsanalyse Stammzell-Gene

Die Co-Expressionsanalyse für Stammzell-assoziierte Gene ergab 31 deutlich veränderte Transkripte, angeführt von CaM kinase like vesicle associated (CAMKV). CAMKV reguliert Calmodulin (CaM)¹⁷⁰, das als Second Messenger relevant ist und in leukämischen Zellen verstärkt exprimiert wird¹⁷¹. Mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich zeigten sich Solute carrier family 7 member 8 (SLC7A8) und Solute carrier family 16 member 9 (SLC16A9).

5.2.1.1.2.1. SLC7A8

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei SLC7A8 eine -2,4-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform 011 dar (Abb. 34). SLC7A8 wird in diversen Tumor-Entitäten verstärkt exprimiert¹⁷² und ist als Aktivator des proliferationsfördernden Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-Signalwegs beschrieben¹⁷³. L-Typ-Aminosäuretransporter sind im Mausmodell an der metabolischen Reprogrammierung bei T-Zell-Neoplasien beteiligt¹⁷⁴. In K562 wird SLC7A8 durch Flavonoide wie Quercetin herunterreguliert¹⁷⁵.

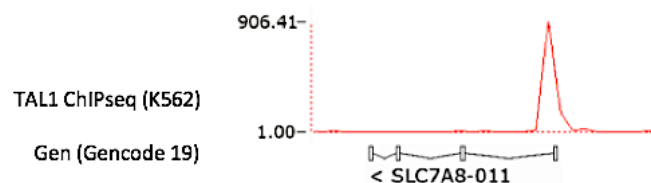


Abb. 34: Zielgen SLC7A8
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.2.2. SLC16A9

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei SLC16A9 eine -2,4-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 001 und 002 dar (Abb. 35). SLC16A9 ist ein Monocarbonsäure-Transporter (MCT). MCT gewährleisten vielfach das Ausschleusen von z.B. Laktat sowie die Aufnahme von Ketonkörpern, also anaerobe Atmung¹⁷⁶.

SLC16A9 transportiert Carnitine, die für den Fettsäurestoffwechsel entscheidend sind: Fettsäuren werden gebunden an Carnitin in Mitochondrien transloziert¹⁷⁷. SLC16A9 wird verstärkt bei TNF α vermittelter Inflammation¹⁷⁸ sowie in einigen therapieresistenten Tumorzellen exprimiert¹⁷⁹. Dies wurde insbesondere für Adriamycin-resistente Zellen gezeigt¹⁸⁰.

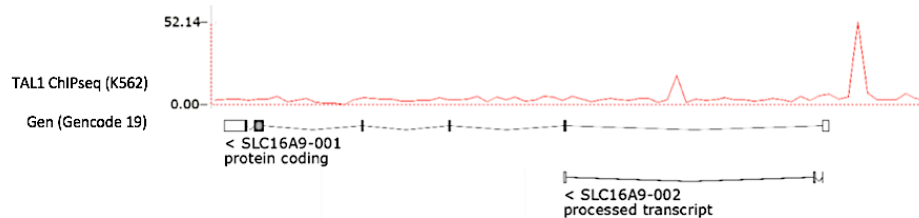


Abb. 35: Zielgen SLC16A9

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.2.3. HES6

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Hes family bHLH transcription factor 6 (HES6) eine -2,0-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein Peak im Promotorbereich aller Isoform dar (Abb. 36). HES6 ist an zahlreichen wichtigen Differenzierungs-Signalwegen beteiligt. Eine Funktion ist das Verhindern der Hairy and enhancer of split-1 (HES1)-Bindung an E-Boxen und damit die Aufhebung HES1-vermittelter Genrepression¹⁸¹. Im Mausmodell der AML gehört HES6 wie RUNX1 und TAL1 zu den hypermethylierten Genen, was auch bei humanen AML-Patienten bestätigt werden konnte¹⁸².

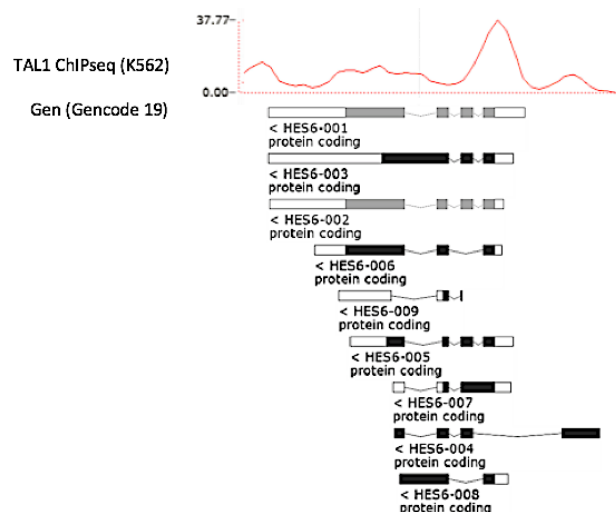


Abb. 36: Zielgen HES6

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.3. GO-Term: Entwicklungsprozess

Betrachtet nach dem GO-Term Entwicklungsprozess zeigten sich EGF-like domain-containing protein 7 (EGFL7) und Retinoic acid receptor responder protein 3 (RARRES3) als regulierte TAL1-Zielgene in K562-Zellen.

5.2.1.1.3.1. EGFL7

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei EGFL7 eine -4,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich zahlreicher Isoformen (Abb. 37). EGFL7 wird physiologisch vor allem in Endothelzellen exprimiert. Der Knockdown im Zebrafisch-Modell verhindert die Bildung von Blutgefäßen (Tubulogenese), die Blutgefäße zeigen kein Lumen¹⁸³. Demgegenüber sind EGFL7-Knockout-Mäuse phänotypisch unauffällig, wird jedoch die im EGFL7-Intron 7 beheimatete mir126 ausgeknockt, so stellen sich über eine Beeinträchtigung des VEGF-abhängigen Akt- und Erk-Signalwegs schwere Schäden der Angiogenese dar¹⁸⁴. Eine erhöhte Expression von EGFL7 ist in Tumoren mit schlechter Prognose vergesellschaftet, zudem korreliert sie mit der Anzahl von Mikrogefäßen und Zellproliferation¹⁸⁵.

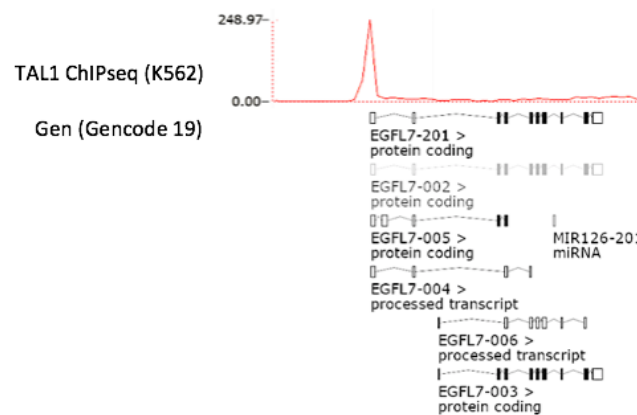


Abb. 37: Zielgen EGFL7

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.3.2. RARRES3

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Retinoic acid receptor responder protein 3 (RARRES3) eine -2,8-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-

Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich aller Isoformen da (Abb. 38). RARRES3 ist p53-Zielgen¹⁸⁶ und agiert über die Acetylierung von Mitgliedern des Wnt/ β -catenin-Signalwegs als Proliferationshemmer¹⁸⁷ und Tumorsuppressor und potentieller Aktivator des Immunproteasoms in verschiedenen Krebszellen¹⁸⁸. Die Herunterregulation von RARRES ist beim Brustkrebs aufgrund verstärkter Adhäsion mit Metastasierung verbunden¹⁸⁹.

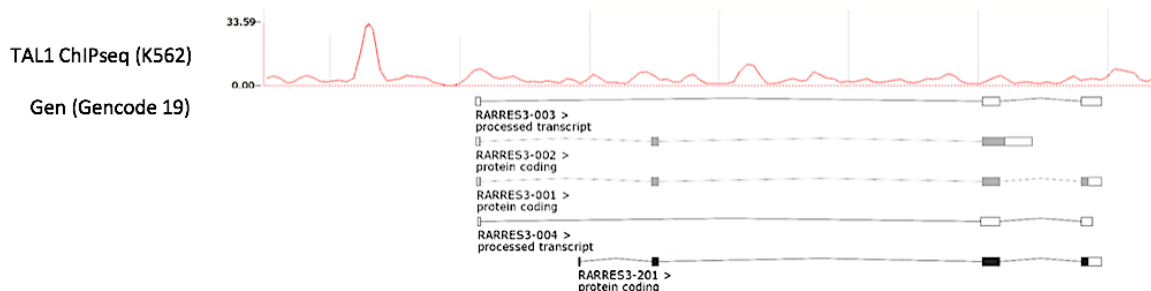


Abb. 38: Zielgen RARRES3
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.4. GO-Term: Sauerstofftransport

Im GO Term 0015671 (Sauerstofftransport) werden 23% der annotierten Gene nach TAL1-Knockdown signifikant herunterreguliert: mit HBA1, HBA2, HBG1 und HBZ insbesondere Untereinheiten des adulten Hämoglobin-Komplexes. Die Term-Mitglieder sind bereits oben dargestellt worden (vgl. 5.2.1.1.1.3 und 5.2.1.1.1.8).

5.2.1.1.5. GO: Transkriptionsfaktoren

Nach Knockdown herunterregulierte TF mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich waren CAAT/enhancer binding protein, epsilon (CEBPE), POU domain class 3 transcription factor 2 (POU3F2) und Krüppel-like factor 15 (KLF15).

5.2.1.1.5.1. CEBPE

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei CEBPE eine -2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der einzig bekannten Isoform 001 dar (Abb. 39). CEBPE ist ein wichtiger TF der myeloischen Reihe, er wird als entscheidend für die Granulopoese angesehen: in der

Maus führt ein Knockout zur absoluten Neutropenie¹⁹⁰. CEBPE reguliert die terminale Differenzierung von Granulozyten und induziert die Expression von Granula-Genen¹⁹¹.



Abb. 39: Zielgen CEBPE
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.5.2. POU3F2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei POU3F2 (auch OCT7 genannt) eine -3,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der einzig bekannten Isoform 001 dar (Abb. 40). POU3F2 ist ein vor allem im ZNS beschriebener TF, der zusammen mit zwei weiteren Faktoren (ASCL1, MYT1L) aus pluripotenten Stammzellen, aber auch bereits aus Fibroblasten Neurone differenzieren kann^{192,193}. Beim Melanom wird POU3F2 mit verminderter Differenzierung und verstärkter Metastasierung assoziiert¹⁹⁴.

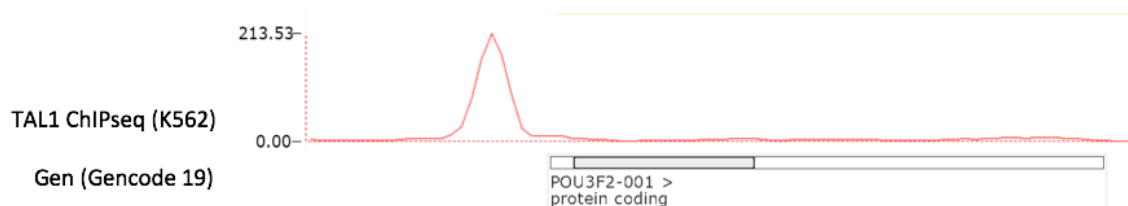


Abb. 40: Zielgen POU3F2
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.5.3. KLF15

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei KLF15 eine -2,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich beider bekannter Isoformen dar (Abb. 41). KLF15 wird als negativer Regulator der Proliferation von Gefäßmuskelzellen nach Verletzung beschrieben¹⁹⁵, zudem ist der TF

am mTORC1-Signalweg und dessen Herunterregulation bei Insulinresistenz beteiligt¹⁹⁶. Die Aktivierung von KLF15 inhibiert die Acetyltransferase p300 und hemmt dadurch die Acetylierung von p53¹⁹⁷.

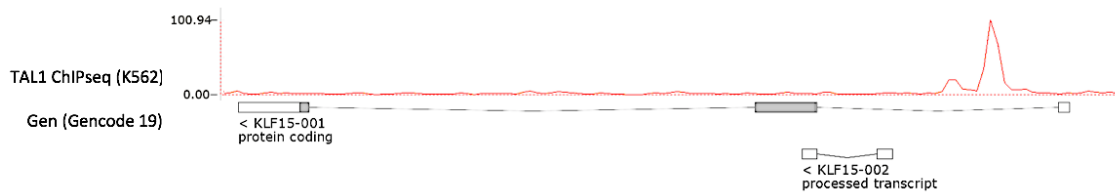


Abb. 41: Zielgen KLF15
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6. Weitere herunterregulierte codierende TAL1-Zielgene

5.2.1.1.6.1. HEPACAM2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei HEPACAM family member 2 (HEPACAM2) eine -2,7-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 002 und 004 dar (Abb. 42). HEPACAM2 wurde auf der Suche nach von einer Mikrodeletion auf Chromosom 7 betroffenen Genen bei AML und MDS entdeckt. Es ist ein mitoserelevantes Gen mit essentieller Beteiligung an der Zentrosomenreifung und Formation der Mikrotubuli: ein Knockdown führt zum Stillstand der Zellteilung in der Prometaphase, zerstörter Chromosomenarchitektur und teils zwei bis dreikernigen Zellen¹⁹⁸.

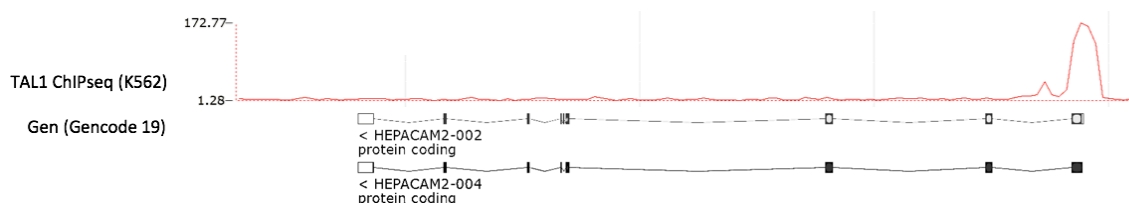


Abb. 42: Zielgen HEPACAM2
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.2. VBP1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei VHL binding protein 1 (VBP1) eine -2,9-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im TSS-Bereich der Isoform 001 dar (Abb. 43). VBP1 agiert als Chaperone und bildet einen intrazellulären Proteinkomplex mit dem Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (pVHL). Über die Bindung an pVHL wird dieser stabilisiert und so die Ubiquitinierung von HIF1alpha ermöglicht; zudem verhindert VBP1 so in vivo eine Tumormetastasierung¹⁹⁹. Weiterhin ist eine VBP1-vermittelte Ubiquitinierung von Human MutS family protein 4 (hMSH4) beschrieben; damit kontrolliert VBP1 den hMSH4-Spiegel und so die Fähigkeit zur Doppelstrangbruchkontrolle im Rahmen der Mitose²⁰⁰.

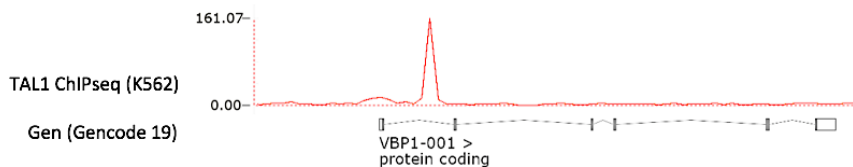


Abb. 43: Zielgen VBP1

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.3. ERM MAP

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Erythroid membrane-associated protein (ERMAP) eine -2,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 005 und 003 dar (Abb. 44). ERM MAPs Polymorphismen machen das Scianna/Rodin-Blutgruppensystem aus; die Expression nimmt interessanterweise infolge der Cytarabin induzierten erythroiden Differenzierung von K562-Zellen zu²⁰¹.

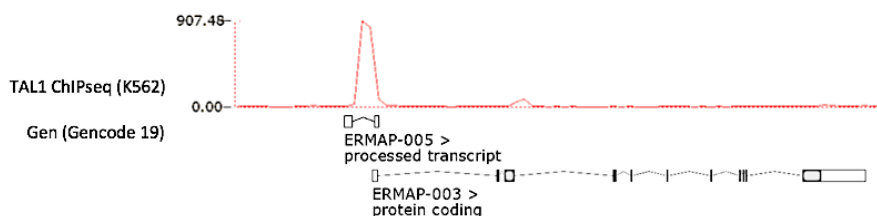


Abb. 44: Zielgen ERM MAP

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.4. MYL4

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei eine -2,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform 006 dar (Abb. 45). MYL4 ist eine in v.a. der Embryonalzeit und in adulten Atrien exprimierte regulatorische Leichtketten-Untereinheit von Myosin. Mutationen in MYL4 sind mit familiärem Vorhofflimmern verbunden; es ist für die kontraktile, elektrische und strukturelle Integrität der Atrien notwendig.

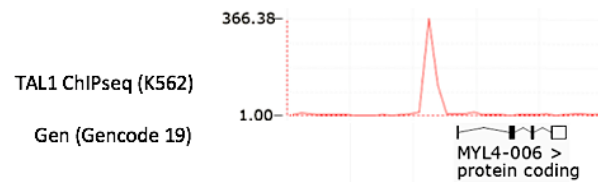


Abb. 45: Zielgen MYL4

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.5. UBE2F

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NEDD8-conjugating enzyme UBE2F (UBE2F) eine -2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich fast aller Isoformen dar (Abb. 46). UBE2F gehört dem humanen Neddylierungssystem (Addition von Nedd8 an Ziel-Lysine) an. Beschrieben ist die Neddylierung des Proliferationshemmers Cullin-5 (CUL5) durch UBE2F, woraus der proteasomale Abbau von Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1, auch NOXA genannt) resultiert. Die Überexpression von UBE2F verringert den PMAIP1-Spiegel und fördert das Wachstum von Lungen-Ca-Zellen; hingegen resultiert aus dem Knockdown deren Apoptose²⁰².

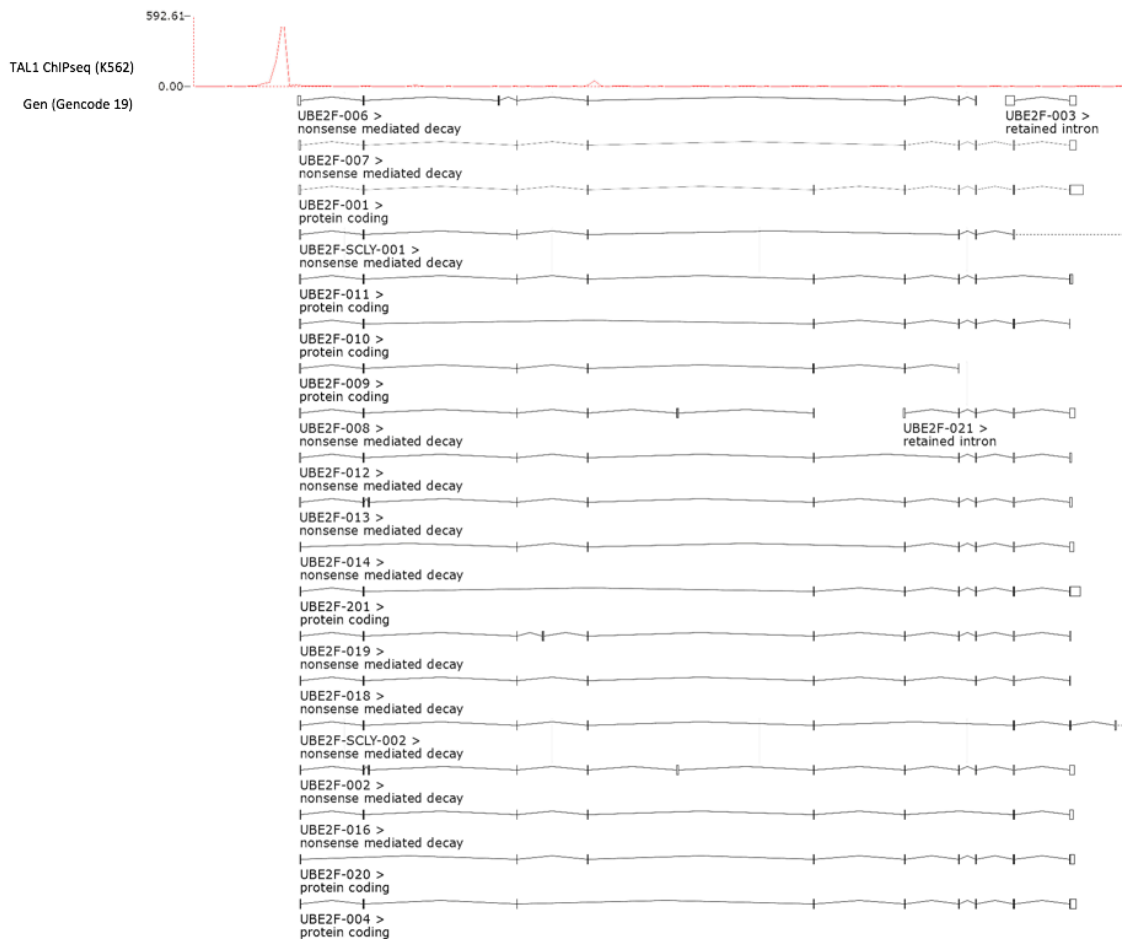


Abb. 46: Zielgen UBE2F
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.6. FAM213B

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei der Prostamide/prostaglandin F synthase (FAM213B) eine -2,7-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich fast aller Isoformen dar (Abb. 47). FAM213B katalysiert die Reaktion von Prostaglandin-ethanolamid H2 (Prostamid H2) zu Prostamid F2(alpha), d.h. einen Schritt der im inflammatorischen Geschehen relevanten Prostaglandin-Synthese aus Arachidonsäure.

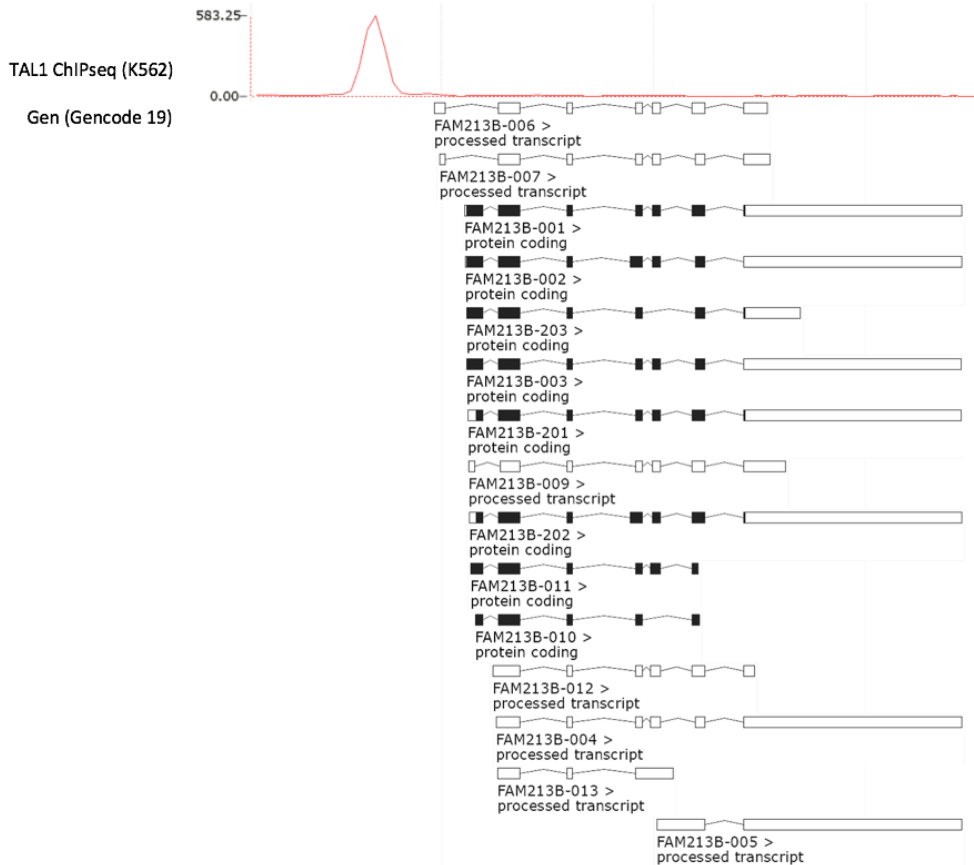


Abb. 47: Zielgen FAM213B
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.1.6.7. NT5M

Fold Change: -2,1. Die 5',3'-nucleotidase, mitochondrial (NT5M) codiert für eine mitochondriale Nucleotidase, die an der Matrix den Pool zur Synthese mitochondrialer DNA benötigter Pyrimidin-2'-deoxyribonucleotide kontrolliert (Schutz vor toxischer Überproduktion)²⁰³.

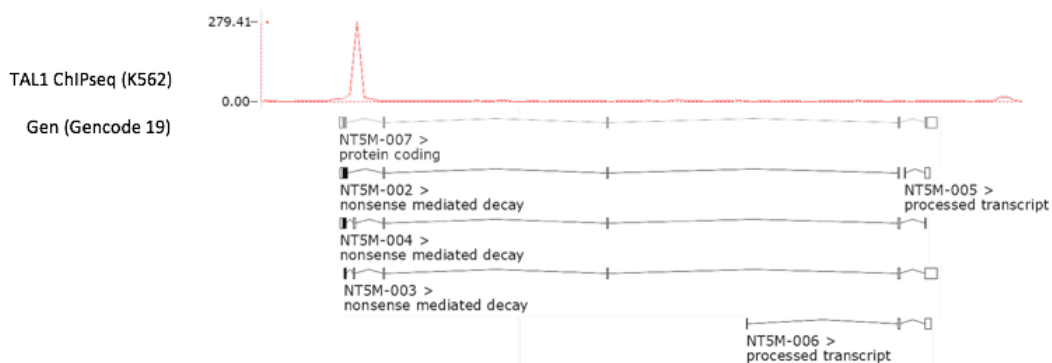


Abb. 48: Zielgen NT5M
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2. Hochregulierte codierende Transkripte

Es folgt die Analyse der nach TAL1-Knockdown hochregulierten Transkripte. Die GO-Auswertung nach biologischem Prozesse zeigt ganz dominant eine Aktivierung der Immunantwort (Abb. 49 und 53), die sich in der Komponenten-Analyse als primär membranassoziiert darstellt (Abb. 50) und funktional Cytokin- und Rezeptoraktivitäten beinhaltet (Abb. 51). Dies bestätigte sich auch in Auswertung nach KEGG-Signalwegen (Abb. 52), die vom NFκB-Signalweg angeführt wird.

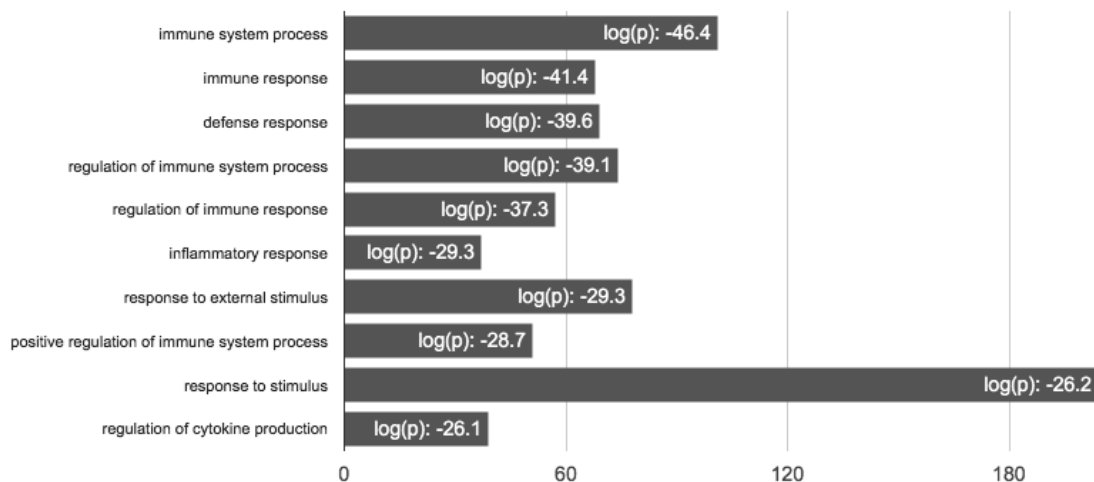


Abb. 49: Hochregulierte Gene: GO biologische Prozesse (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p-Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

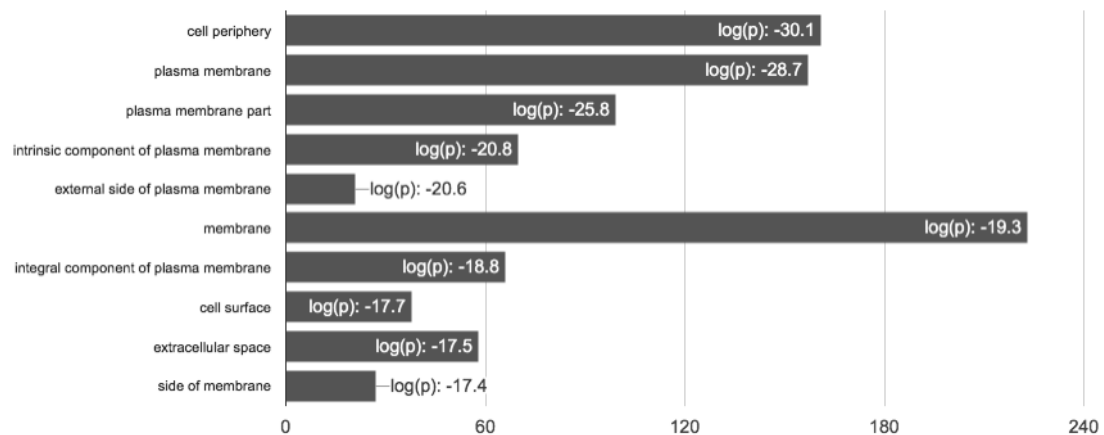


Abb. 50: Hochregulierte Gene: GO Zelluläre Verteilung (Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p-Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

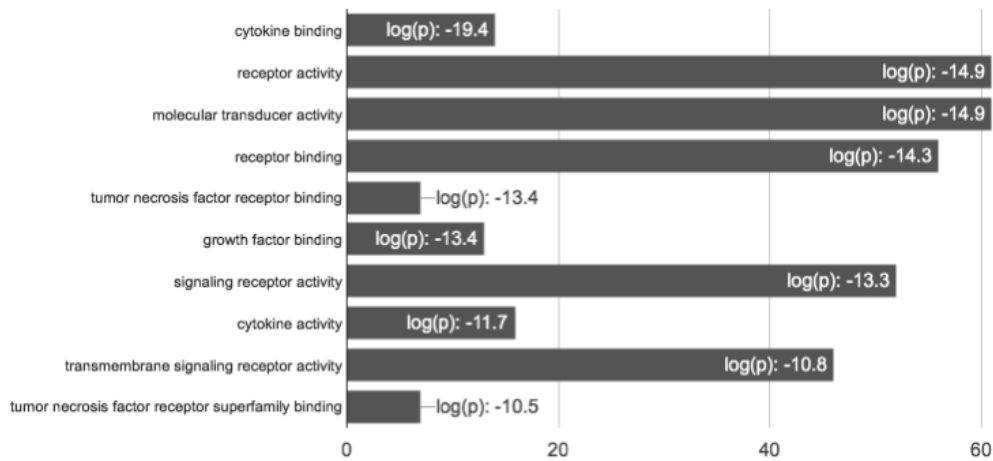


Abb. 51: Hochregulierte Gene & molekulare Funktion
(Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p-Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

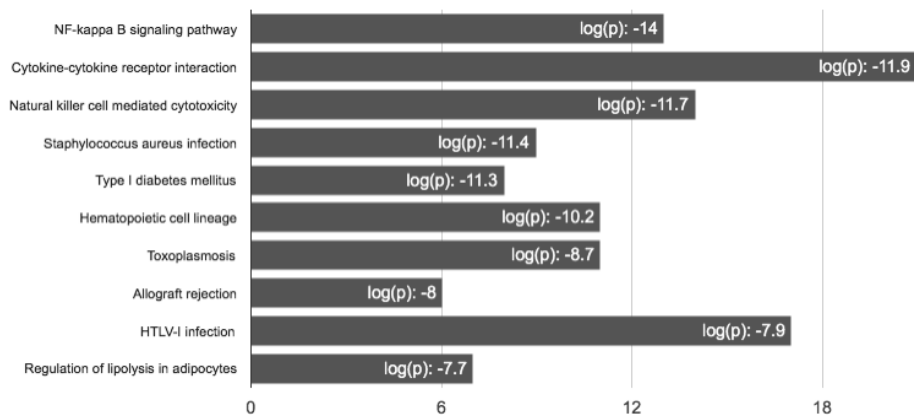


Abb. 52: Hochregulierte Gene & relevante KEGG-Signalwege
(Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p-Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

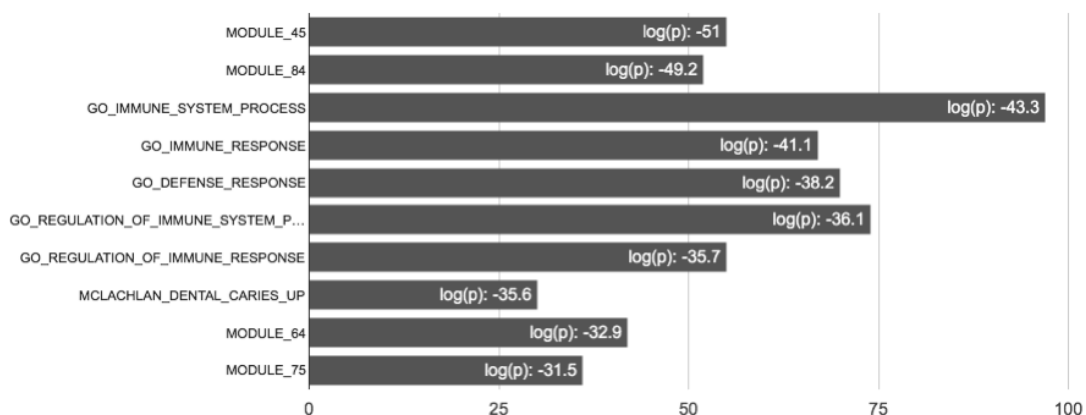


Abb. 53: Hochregulierte Gene & molekulare Signatur
(Programm HOMER, Anordnung mit niedrigstem p-Wert an der Spitze. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die Anzahl der Treffer im Knockdown Datensatz).

5.2.1.2.1. Hochregulierte Transkriptionsfaktoren

An der Spitze der vom TAL1-Knockdown hochregulierten TF stehen Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 (NR4A2, vgl. Abschnitt 5.2.1.2.2), Runt related transcription factor 3 (RUNX3, +3,97-fach) und Aryl hydrocarbon receptor (AHR, +3,76-fach). Weitere TF wie Forkhead Box O6 (FOXO6, +3,55-fach), Runt related transcription factor 2 (RUNX2, +3,26-fach) und Inhibitor of DNA binding 3 (ID3, +3,2-fach) stellten sich ebenfalls relevant expressionsverändert dar; eine TAL1-Bindung im Promotorbereich liess sich bei nach Knockdown hochregulierten TF jedoch nur bei NR4A2 nachweisen.

5.2.1.2.2. NR4A2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NR4A2 eine +4,47-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich aller Isoformen dar (Abb. 54). NR4A2 wird von externen Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Cytokinen induziert und ist an Zellproliferation, Transformation, Invasion und Migration sowie Chemoresistenz bei Plattenepithelkarzinomen beteiligt²⁰⁴⁻²⁰⁸. Eine NR4A2-Überexpression hebt die p53-vermittelte Hemmung der Zellproliferation auf²⁰⁹.

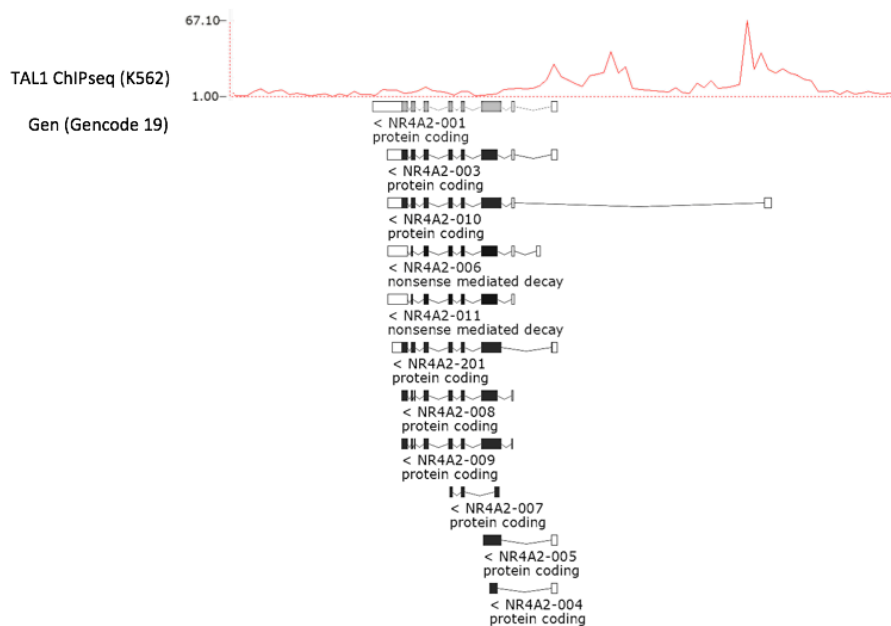


Abb. 54: Zielgen NR4A2
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.3. Zytokin-Zytokin Rezeptor-Interaktionen (KEGG)

TAL1 beeinflusst in K562-Zellen nach dem Ergebnis der KEGG-Analyse insbesondere Lymphotoxin beta (LTB, +14,3-fach), C-X-C motif chemokine receptor 3 (CXCR3, +11,1-fach), Interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB, +7,91-fach) und TNF superfamily member 10 (TNFSF10, +7,1-fach). Als hochreguliertes neues TAL1-Zielgen in K562-Zellen stellte sich jedoch nur Interleukin-1 receptor-like 1 (IL1RL1) dar.

5.2.1.2.3.1. IL1RL1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei IL1RL1 eine +4,87-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 002 bis 008 dar (Abb. 56). IL1RL1 codiert für eine lösliche (sST2) und eine membrangebundene Isoform (ST2). ST2 bildet den Rezeptor für IL-33; nach Aktivierung erfolgt eine Phosphorylierung verschiedener MAP-Kinasen sowie NF κ B²¹⁰. IL-33 ist bei der Reifung von Th2-Zellen, Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und NK-Zellen beteiligt. Es wird permanent in Endothelien sowie in einigen Epithelien exprimiert und agiert mutmasslich auch als Gewebsverletzung-Alarmin²¹¹. Eine pathologische/ektopische Expression ist bei der CML auf CD34+ Progenitoren zu beobachten: hier verhindert IL-33 über die Bindung an ST2 die Imatinib-Wirkung, wohingegen sST2 mit der Krankheitslast korreliert²¹². Abhängig vom Typ der Leukämie ist jedoch auch eine IL-33-vermittelte Proliferationshemmung möglich²¹³.

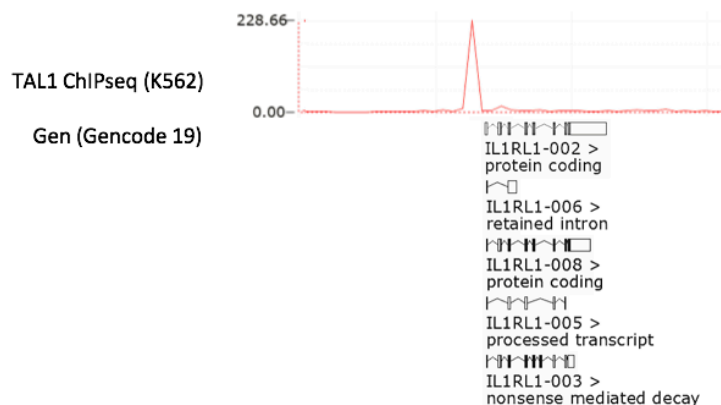


Abb. 55: Zielgen IL1RL1
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.4. ECM-Rezeptor Interaktionen (KEGG)

Die extrazelluläre Matrix bildet das Gerüst der spezialisierten Zellen und ist dementsprechend für Differenzierung bzw. Cancerogenese essentiell. TAL1 beeinflusst mit Integrin beta-7 (ITGB7, +4,11-fach) und Collagen Type III Alpha 1 Chain (COL3A1, +2,45-fach) häufig vertretene Integrine und Collagene. Diese stellten sich jedoch nicht als TAL1-Zielgene in K562-Zellen dar.

5.2.1.2.5. KEGG: Hämatopoetische Differenzierung

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich in der KEGG-Analyse eine verstärkte Expression von Differenzierungsmarkern der myeloiden (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, +2,88-fach), Interleukin-3 receptor (CD123, + 4,14-fach), Integrin α -M (CD11b, +3,14-fach), aber auch lymphoiden Reihe (T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain (CD3G, +5,5-fach), T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain (CD3E, +3,38-fach), T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain (CD3D, +2,66-fach). Als TAL1-Zielgen stellte sich Fc fragment of IgE receptor II (FCER2, auch CD23 genannt) dar.

5.2.1.2.5.1. FCER2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei FCER2 eine +3,91-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 002, 007 und 201 dar (Abb. 56). FCER2 wird auf reifen B-Zellen, folliculären dendritischen Zellen, aktivierten Makrophagen, Thrombozyten und eosinophilen Granulozyten exprimiert²¹⁴, ist ein Zielgen im NOTCH2-Signalweg²¹⁵ und Marker der CLL²¹⁶.

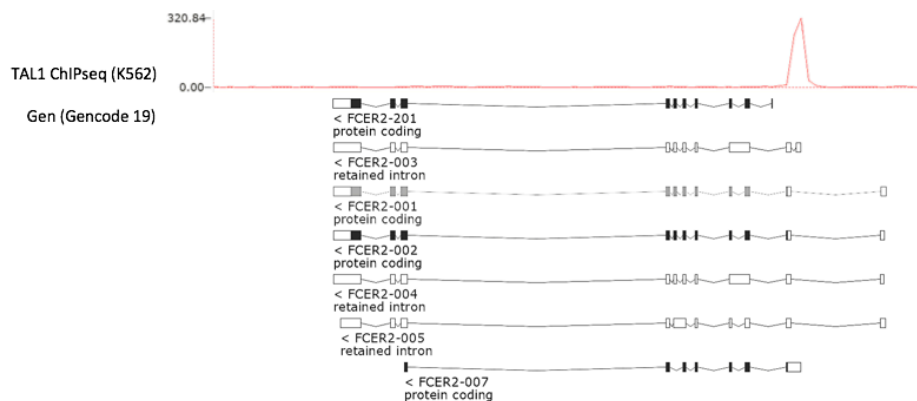


Abb. 56: Zielgen FCER

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.6. KEGG: TCR

Wie bereits oben angesprochen kommt es nach TAL1-Knockdown zu umfangreichen Expressionveränderung des T-Zellrezeptor-Komplexes (CD3G +5,5-fach, CD3E +3,4-fach, CD3D +2,7-fach) ohne dass die o.g. CD3-Untereinheiten und SLP-76 (+2,5-fach), TAL1-Zielgene in K562-Zellen wären. Dies gilt jedoch für SH2 domain containing 2A (SH2D2A, auch T cell-specific adaptor protein (TSAd) genannt).

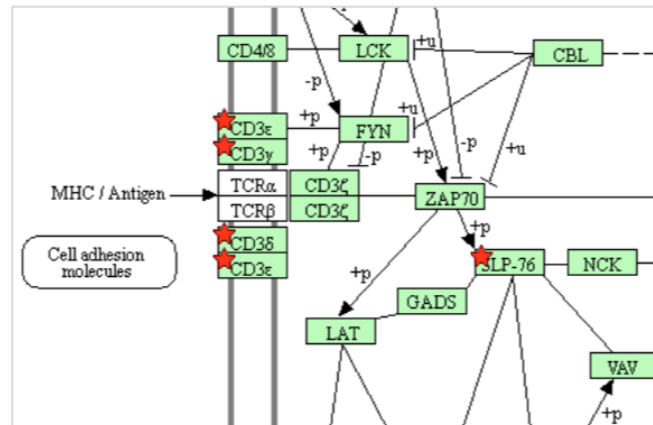


Abb. 57: KEGG: TCR

Ausschnitt aus dem KEGG TCR-Diagramm. Nach TAL1-Knockdown kommt es u.a. zur Hochregulation von CD3G, CD3E, CD3D und SLP-76, rote Sterne.

5.2.1.2.6.1. SH2D2A

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei eine +2,25-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein Peak im Promotorbereich aller Isoformen dar (Abb. 58). SH2D2A ist ein T-Zell-spezifisches Protein mit postulierter Rolle der Aktivierung der Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase (LCK), die an der Signalkaskade vom TCR durch Initiation einer Phosphorylierungskette beteiligt ist²¹⁷. Desweiteren wird eine TF-Aktivität mit nukleärer Translokation von SH2D2A und insbesondere Heraufregulation von IL-2 beschrieben²¹⁸. Aus dem Knockout resultiert im Mausmodell ein Lupus-ähnliches Krankheitsbild mit Hypergammaglobulinämie und anti-nukleären sowie anti-DNA-AK; eine wichtige Rolle bei der T-Zellapoptose ist daher anzunehmen²¹⁹.

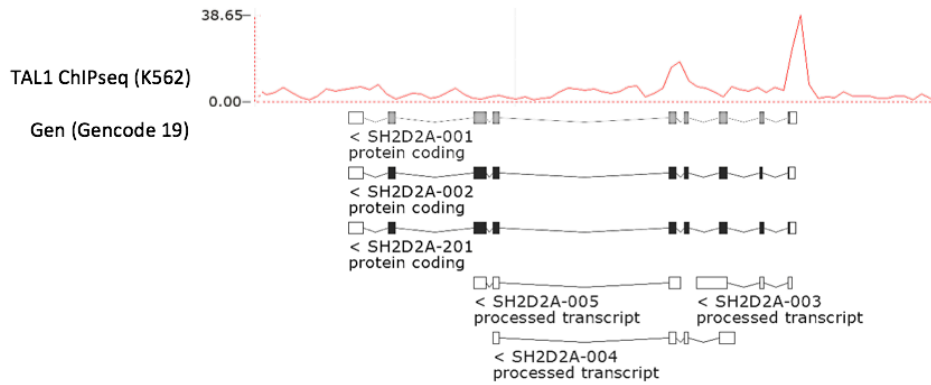


Abb. 58: Zielgen SH2D2A
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.7. KEGG: B-Zellrezeptor-Signalweg

Im B-Zellrezeptor-Signalweg (vgl. Abb. 59) werden nach TAL1-Knockdown die B-Zell-Differenzierungsantigene CD72 (+2,02-fach) und CD79A (+2,04-fach), die Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (INPP5D bzw. auch SHIP genannt, +2,18-fach) sowie weitere Mitglieder wie die Phospholipase C gamma 2 (PLCG2, +2,33-fach) hochreguliert.

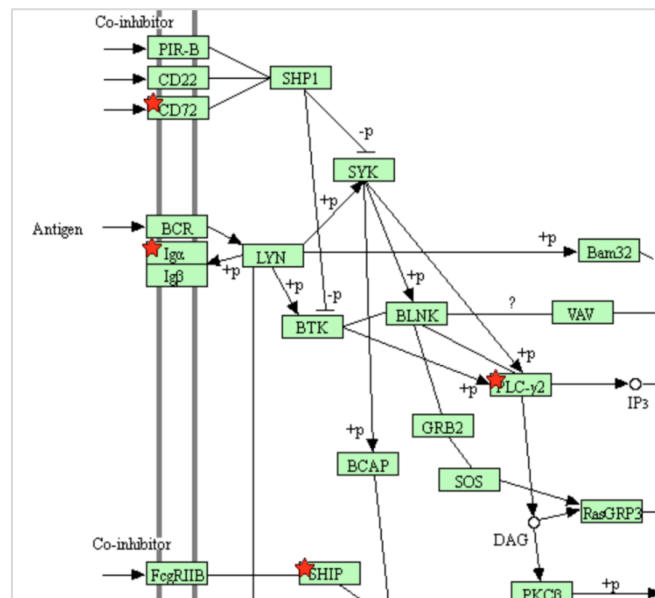


Abb. 59: KEGG B-Zellrezeptor Signalweg
 Ausschnitt aus dem KEGG BCR-Signalweg. Nach TAL1-Knockdown kommt es u.a. zur Hochregulation von CD72, CD79A (Iga), SHIP (INPP5D) und PLCG2.

5.2.1.2.8. KEGG: Fokalkontakte

Die KEGG-Signalwegsanalyse zeigt im Hinblick auf veränderte Zelladhäsion relevante Veränderungen der Integrin- (u.a. Integrin beta 7, ITGB7) und Rezeptortyrosinkinase-Expression sowie auch von Downstream gelegenen Mitgliedern der mit der Adhäsion vernetzten Regulation von Zellbeweglichkeit- und Proliferation.

5.2.1.2.8.1. ITGB7

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei eine +4,11-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 006 und 013 dar (Abb. 60). ITGB7 (auch „Peyer patches-specific homing receptor LPAM-1“ genannt) vermittelt als Zelladhäsionsprotein insbesondere das Homing von Lymphozyten in den Gastrointestinaltrakt (GIT). Dies geschieht über die Bindung von ITGB7 an das auf Endothelzellen des GIT exprimierte Adhäsionsprotein MADCAM1^{220,221}. ITGB7 ist zudem beim Multiplen Myelom an Zelladhäsion, -migration und -invasion relevant beteiligt²²².

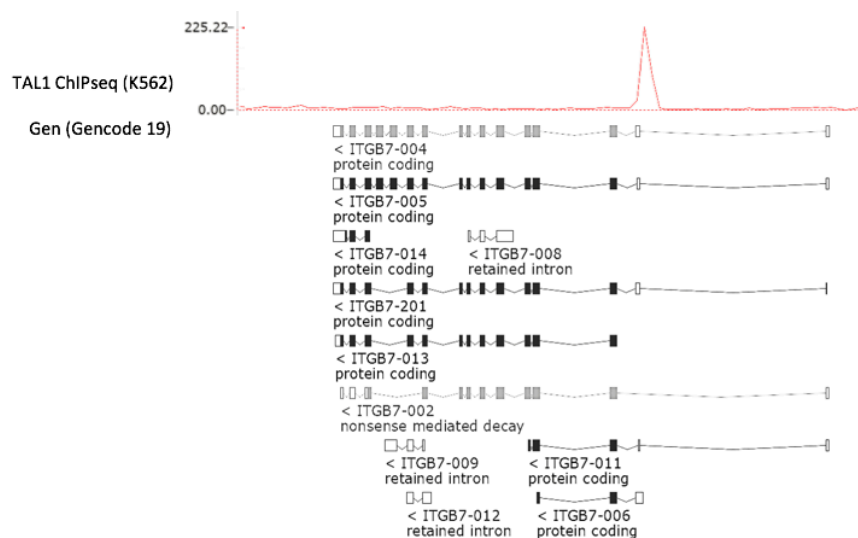


Abb. 60: Zielgen ITGB7

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.9. KEGG: Antigen-Präsentierung -und Prozessierung

Mit HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain (HLA-DRA, +4,14-fach) und HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain (HLA-DRB1, +3,52-fach) werden nach TAL1-Knockdown insbesondere antigen-präsentierende Moleküle

hochreguliert, dies gilt auch für weitere Signalwegskomponenten (CD74/li/SLIP/CLIP, +3,42-fach) sowie Interferon Gamma (IFNG, +3,97-fach).

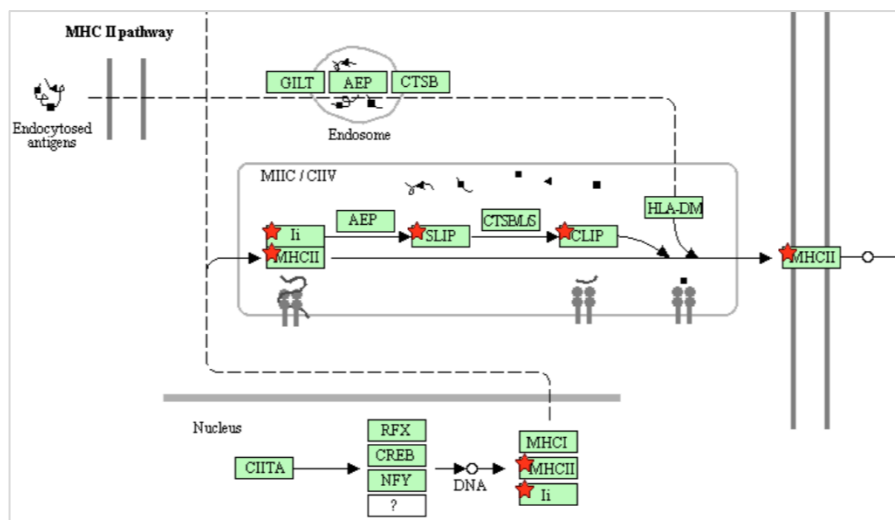


Abb. 61: KEGG Antigen-Prozessierung und Präsentation
 Ausschnitt aus dem o.g. KEGG-Signalweg. Nach TAL1-Knockdown zeigen sich insbesondere HLA-Klasse II-Moleküle und Mitglieder der endosomalen Prozessierung wie CD74 hochreguliert.

5.2.1.2.10. KEGG: JAK-STAT Signalweg

Der Januskinase (JAK)-Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg dient der schnellen Übermittlung von extrazellulären Informationen in den Nucleus, woraus vor allem eine verstärkte Zellproliferation und Regulation der Apoptose resultiert. Nach TAL1-Knockdown zeigen sich mit den Interleukin-Rezeptoren 2- (IL2RB, +7,91-fach), -3 (IL3RA, +4,14-fach), -10 (IL10RA, +2,86-fach), -22 (IL22RA1, +2,17-fach) und -23 (IL23A, +2,09-fach) zahlreiche JAK-gebundene Cytokinrezeptoren hochreguliert. Hier führt der JAK-STAT-Signalweg beginnend am IL2-Rezeptor beispielsweise zur klonalen Expansion von T-Zellen. Neben des proliferationsfördernden PI3K-AKT-Signalwegs wird jedoch auch der negative JAK-STAT-Regulator, Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) hochreguliert - in K562-Zellen ein neues TAL1-Zielgen.

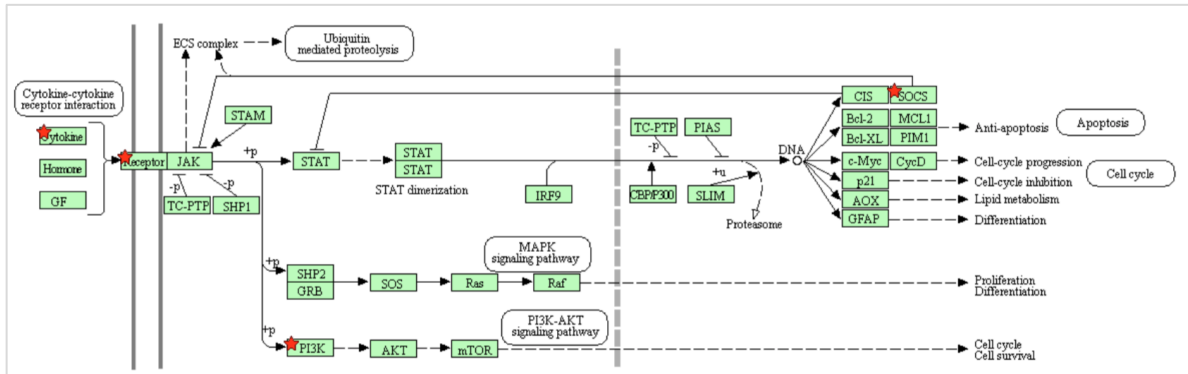


Abb. 62: KEGG JAK-STAT Signalweg

Ausschnitt aus dem o.g. Signalweg. Nach TAL1-Knockdown werden zahlreiche Interleukin-Rezeptoren (u.a. IL2RB, IL3RA, IL10RA), aber auch SOCS1 hochreguliert.

5.2.1.2.10.1. SOCS1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei SOCS1 eine +2,36-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 63). SOCS1 ist Teil eines negativen Feedback-Mechanismus für JAK/STAT3-induzierte Zytokine über JAK-Bindung und Abschwächung deren Kinaseaktivität²²³ mittels einer 12-Aminosäuren zählende Kinase-inhibierende Region (KIR). Eine SOCS1-Expression folgt zudem aus der Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen KIT, FLT3 und FGFR3²²⁴. Die Überexpression führt zur Unterdrückung von Leukemia inhibitory factor (LIF)²²⁵. Weiterhin gehen zahlreiche Tumorerkrankungen mit SOCS-Hypermethylierungen einher²²⁶. SOCS1 wirkt im Rahmen eines proliferationsfördernden Cytokin-Umfelds als Tumorsuppressor, während es unter anti-proliferativen Massnahmen onkogene Eigenschaften haben kann²²⁷. In K562-Zellen wird es infolge der Behandlung mit Imatinib 2,46-fach herunterreguliert²²⁸.

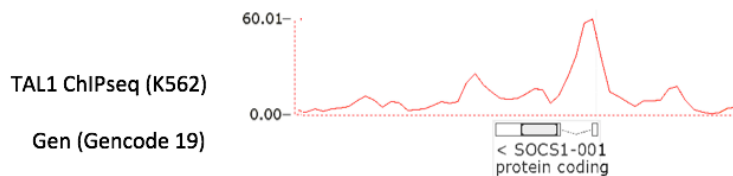


Abb. 63: Zielgen SOCS1

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.10.2. PIK3CD

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform (PIK3CD) eine +2,05-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im TSS fast aller Isoform dar (Abb. 64). PIK3CD codiert für die katalytische Untereinheit P110 δ der Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), die primär in Leukozyten exprimiert wird und dort eine wichtige Rolle in der TCR bzw. BCR-Aktivierung sowie bei neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen spielt (PI3K-Akt-mTOR-Signalweg)²²⁹. Bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) resultiert das Targeting von P110 δ durch Idelalisib in einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens²³⁰.

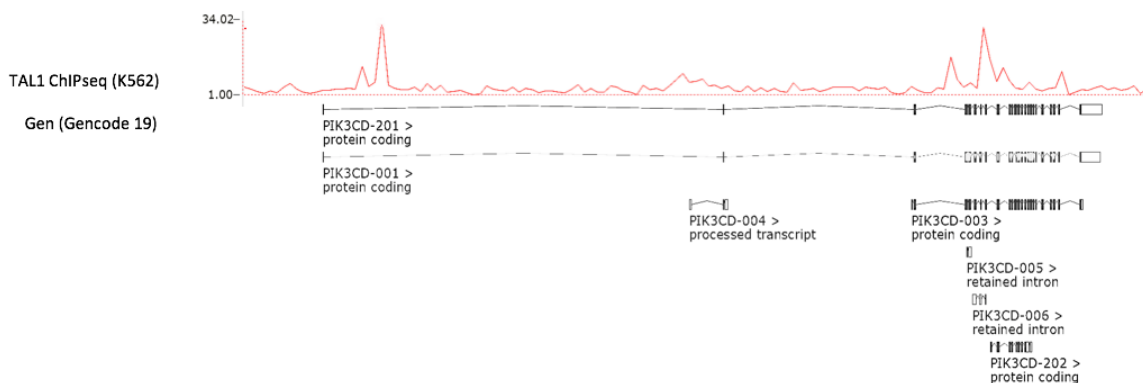


Abb. 64: Zielgen PIK3CD
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.10.3. IL23A

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Interleukin 23A (IL23A) eine +2,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 65). IL23A bildet zusammen mit dem IL23B-Produkt das Zytokin IL23. IL23 ist bei autoimmuner Inflammation beteiligt und führt bei Tumorerkrankungen zu verstärkter Inflammation, Angiogenese und verminderter Infiltration durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen²³². IL23 führt zur TH1-Zell-vermittelten Rekrutierung von Immunzellen sowie zur verstärkten Interferon-Gamma-Sekretion von TH1- und Gedächtnis-T-Zellen²³¹. Beim Colon-Ca wird IL23 durch Tumor-assoziierte myeloide Zellen sezerniert, die wahrscheinlich durch das lokale Mikrobiom aktiviert werden²³³.

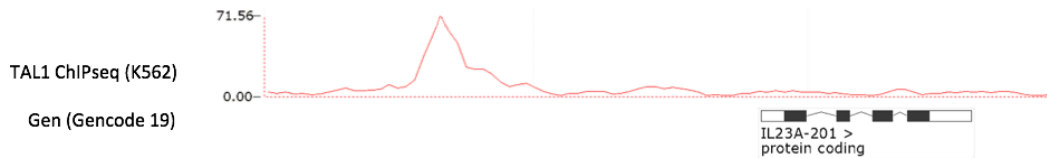


Abb. 65: Zielgen *IL23A*
 Dargestellt ist der Track der *TAL1*-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.11. KEGG: Wnt-Signalweg

Zusammengefasst binden im Wnt (für “Wingless/Integrated”)-Signalweg Mitglieder der Wnt-Proteinfamilie an einen unter Beteiligung von Frizzled gebildeten Rezeptorkomplex, woraus am Ende des Signalwegs eine Inhibition des Abbaus von β -Catenin resultiert. Dieses reguliert nun als TF-Co-Faktor im Nukleus die Expression von Zielgenen wie u.a. *MYC*. Als neue *TAL1*-Zielgene in K562-Zellen zeigten sich *Sclerostin (SOST)* und *Transmembrane protein 64 (TMEM64)*.

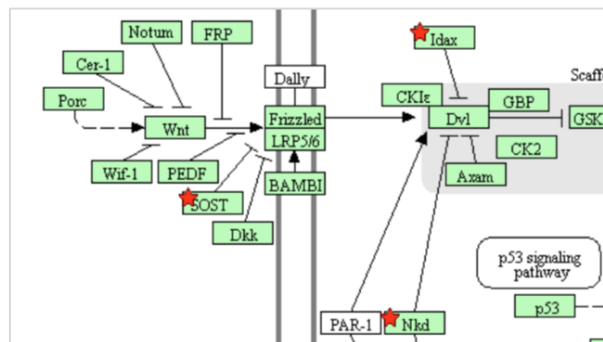


Abb. 66: KEGG: *Wnt*-Signalweg
 Ausschnitt aus dem o.g. KEGG-Signalweg. Nach *TAL1*-Knockdown kommt es zur Heraufregulation der *Wnt*-Antagonisten *SOST* (+6,32-fach), *IDAX (CXXC4)*, +5,27-fach) und *NKD2* (+2,28-fach).

5.2.1.2.11.1. *SOST*

Nach *TAL1*-Knockdown zeigt sich bei *SOST* eine +6,32-fache Expressionsveränderung; in der *TAL1*-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der dar (Abb. 67). *SOST* ist ein negativer Regulator im *Wnt*-Signalweg, so dass bei Tumorzellen des Retinoblastoms infolge des *SOST*-Knockdowns eine verstärkte Proliferation, Invasion und Aufhebung der Apoptose resultiert²³⁴. Physiologisch ist *SOST* Zielgen des Parathormons und inhibiert das Knochenwachstum²³⁵.

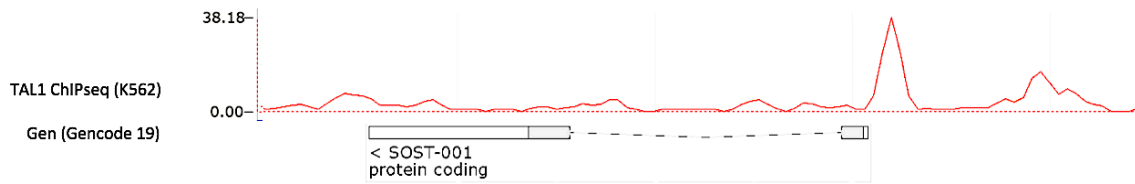


Abb. 67: Zielgen SOST

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.11.2. TMEM64

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei TMEM64 eine +2,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 001, 002 und 201 dar (Abb. 68). TMEM64 beeinflusst über die Regulation von β -Catenin (CTNNB1) die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen statt zur Adipogenese hin zur Osteogenese; die Überexpression von TMEM64 inhibiert die Osteo- und fördert die Adipogenese über die Verringerung von β -Catenin²³⁶.

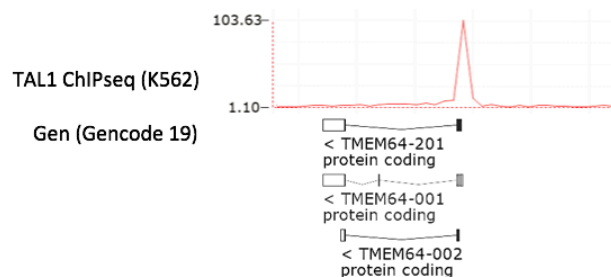


Abb. 68: Zielgen TMEM64

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12. Weitere hochregulierte codierende TAL1-Zielgene

5.2.1.2.12.1. TANK

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) eine +2,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 003, 013 und 018 dar (Abb. 69). TANK interagiert mit mehreren Mitgliedern des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Kinase-Komplexes (IKK)²³⁷ und ist damit - sowie via Ubiquitinierung von TRAF-Proteinen - an der Regulation des NFkB-Signalweg beteiligt²³⁸.

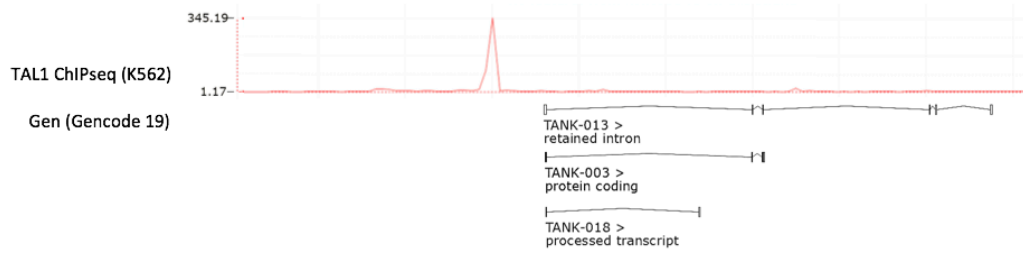


Abb. 69: Zielgen TANK
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.2. BCL3

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei B cell leukemia/lymphoma 3 (BCL3) eine +3,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak a.e. im Promotorbereich der Isoform 007 dar (Abb. 70). BCL3 ist über die Stabilisierung der DNA-Bindung von p50-Homodimeren und der resultierenden Verhinderung der Bindung von aktiven Dimeren primär ein negativer Regulator im TLR/NFκB-Signalweg^{239,240}; kontextabhängig ist jedoch auch eine verstärkte Expression von NFκB-Zielgenen möglich²⁴¹. Aus der Überexpression resultiert über die Interaktion mit Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2) die Unterdrückung der p53-Aktivierung sowie p53-induzierter Apoptose²⁴². BCL3 wird u.a. in vielen anaplastischen grosszelligen Lymphomen und in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen überexprimiert²⁴³; dies ist auch beim Multiplen Myelom zu beobachten²⁴⁴, während eine physiologische BCL3-Rolle in der Entwicklung und Regulation der erworbenen Immunantwort besteht²⁴⁵.

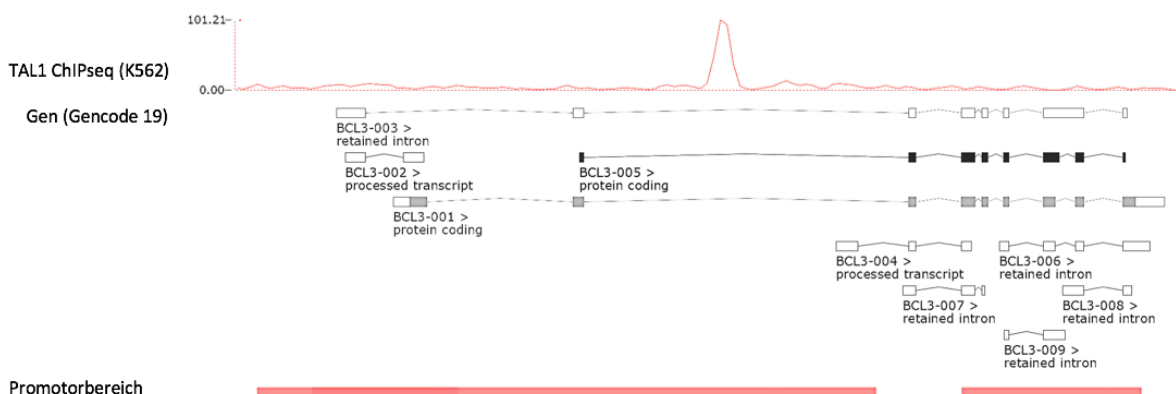


Abb. 70: Zielgen BCL3
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation, unten der Ensembl-Track regulatorische Elemente mit der roten Farbcodierung für einen langgestreckten Promotorbereich (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.3. ADAM8

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei ADAM metallopeptidase domain 8 (ADAM8) eine +2,9-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der meisten Isoformen dar (Abb. 71). ADAM8 spielt eine Rolle bei Inflammation, Adhäsion und Angiogenese²⁴⁶. Eine weitere Funktion ist die Interaktion mit $\alpha 9\beta 1$ -Integrin zur Osteoklastendifferenzierung²⁴⁷. Die Überexpression von ADAM8 ist mit Tumorzell-Migration und -Invasion verbunden^{248,249}. Zudem zeichnen sich Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI)-resistente CML-Stammzellen durch ADAM8-Expression aus; die ADAM8-Hemmung führt hier in vitro zur erneuten TKI-Sensitivität²⁵⁰.

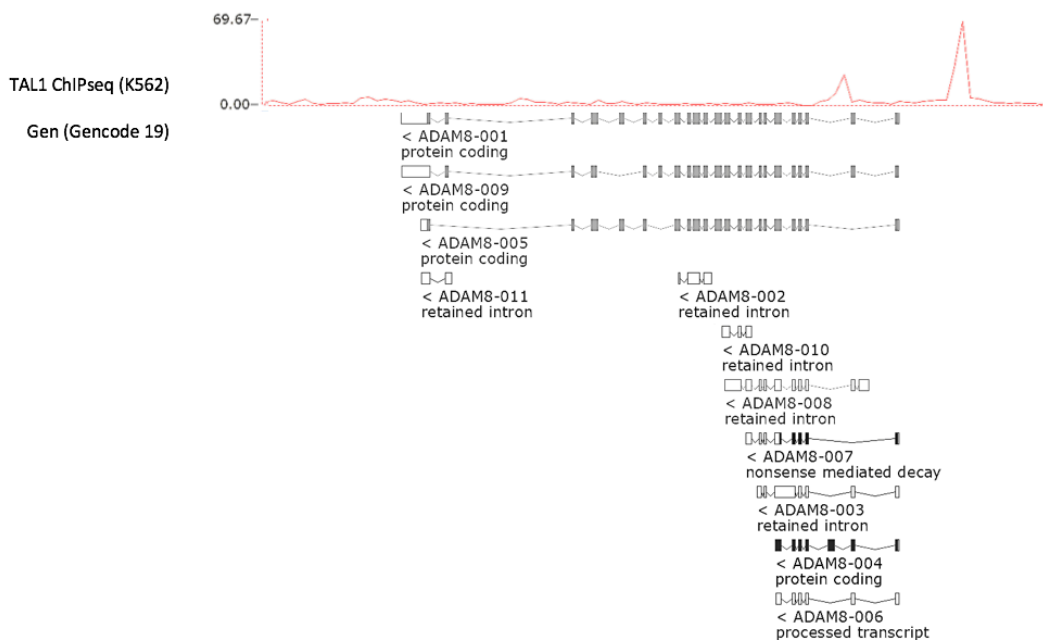


Abb. 71: Zielgen ADAM8
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.4. YPEL3

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Yippee like 3 (YPEL3) eine +2,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein Peak im Promotorbereich dar (Abb. 72). YPEL3 wurde in myeloblastischen Zellen als Apoptose-assoziiertes, proliferationshemmendes Protein entdeckt²⁵¹ und nachfolgend als neuer Tumorsuppressor und p53-Zielgen beschrieben, der nach DNA-Schäden in normalen und entarteten Zellen Seneszenz induziert²⁵².

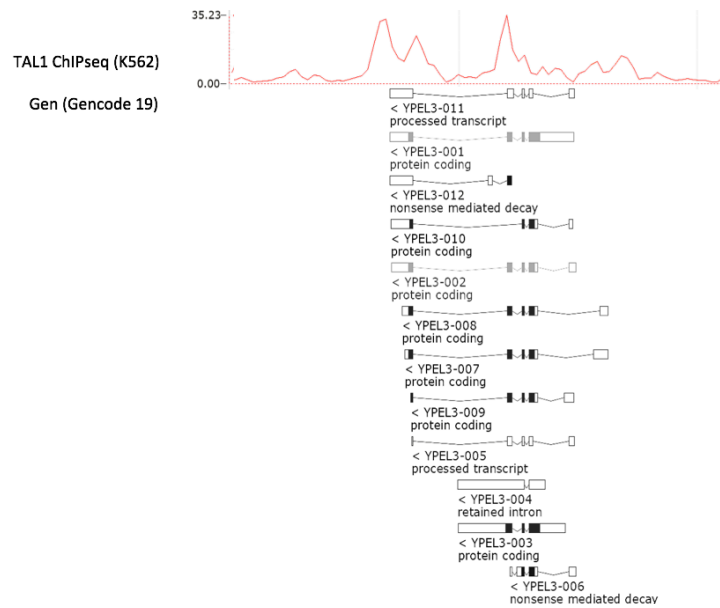


Abb. 72: Zielgen YPEL3
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.5. ATG16L2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Autophagy related 16 like 2 (ATG16L2) eine +2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb.73). Die Funktion ATG16L2 ist aktuell noch ungeklärt²⁵³. In einer Analyse zeigte sich jedoch bei 42% der T-ALL, 27% der B-ALL und 69% der CML-Patienten eine Hypermethylierung im ATG16L2-Promotorbereich, die bei CML-Patienten mit einem signifikant reduzierten Ansprechen auf Imatinib einherging²⁵⁴.

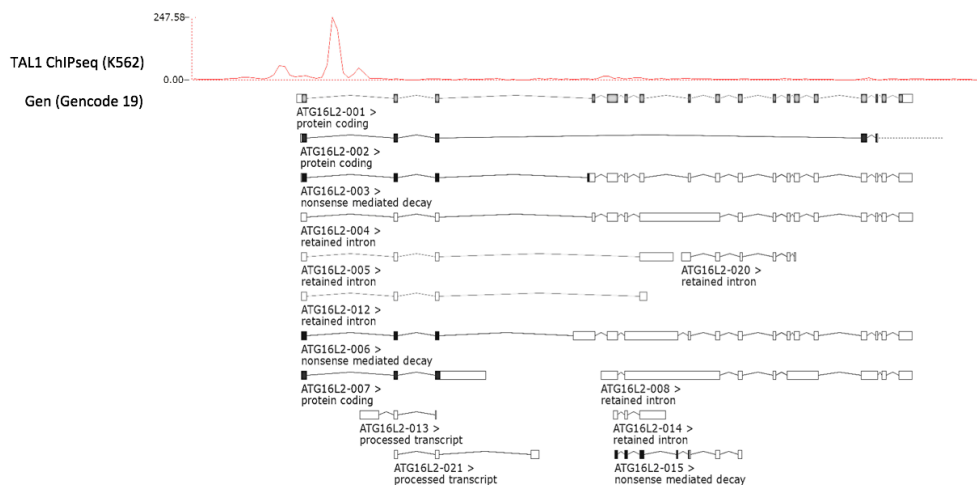


Abb. 73: Zielgen ATG16L2
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten)

5.2.1.2.12.6. ABCA7

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei ATP-binding cassette sub-family A member 7 (ABCA7) eine +2,5-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 74). ABCA7 wird primär im ZNS und myelo lymphatischem Gewebe exprimiert; hier nimmt die Expression während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu, wo sie von LDL weiter gesteigert, von HDL gesenkt werden kann²⁵⁵. Im ZNS ist Lysophosphatidylcholin das primäre ABCA7-Substrat²⁵⁶; dieses wird als Lipotoxin beschrieben²⁵⁷ und ist häufiges Ziel von Anti-Lipid-Antikörpern bei sporadischen humanen monoklonalen Gammopathien²⁵⁸. Eine ABCA7-Inaktivierung verdoppelt nach einer Studie das Risiko einer Alzheimer-Erkrankung²⁵⁹.

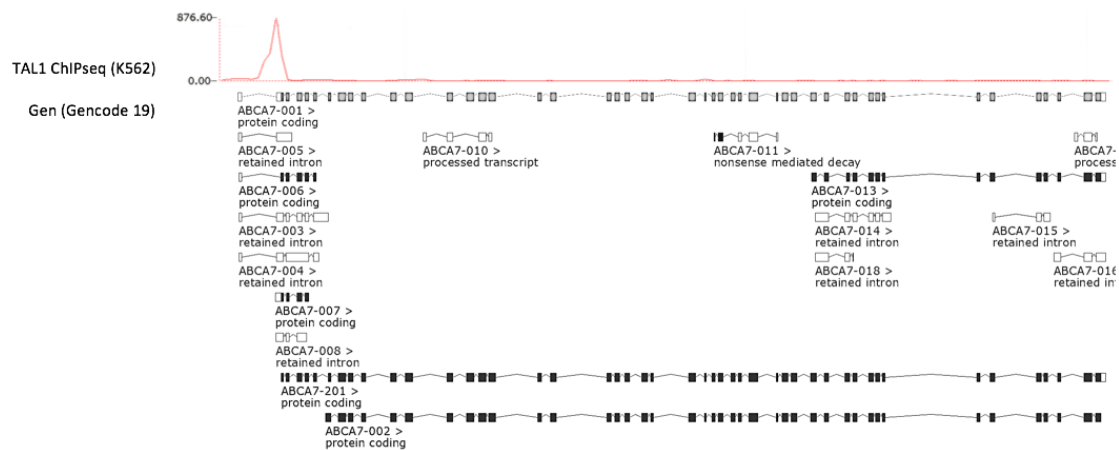


Abb. 74: Zielgen ABCA7
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.7. PBXIP1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (PBXIP1) eine +3,3-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 75). PBXIP1 verhindert als Co-Repressor die DNA-Bindung von Pre-B-cell leukemia TF (PBX) und reguliert so deren Aktivität (PBX-HOX und PBX-E2A)²⁶⁰. In K562-Zellen resultiert aus einer Überexpression die erythroide Differenzierung, in CD34+ Zellen die vermehrte Bildung von koloniebildenden Einheiten der Hämatopoese; in beiden Zellarten geht dies mit verstärkter Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs einher²⁶¹. Weiterhin ist nach Induktion der erythroiden Differenzierung in K562 durch Erythropoetin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) eine verstärkte PBXIP1-Expression sowie Rekrutierung von

GATA1 und CTCF an den PBXIP1-Promotor zu verzeichnen²⁶¹. PBXIP1 wird bei zahlreichen Tumorentitäten verstärkt exprimiert und geht mit vermehrter Migration, Invasion und Metastasierung einher²⁶²⁻²⁶⁵.

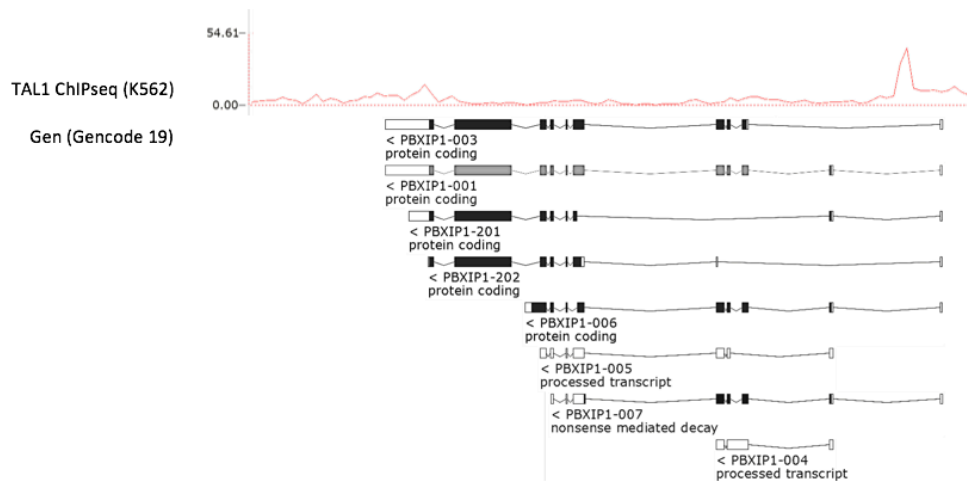


Abb. 75: Zielgen PBXIP1
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.8. FUCA1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Alpha-L-fucosidase 1 (FUCA1) eine 2,8-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 76). FUCA1 ist ein lysosomales Enzym das beim Abbau von fucosehaltigen Glykoproteinen und -lipiden beteiligt ist. Hier spielt Fucose eine wichtige Rolle in Wachstum, Invasion und Metastase. FUCA1 zählt zu den p53-induzierten Genen.^{266,267}

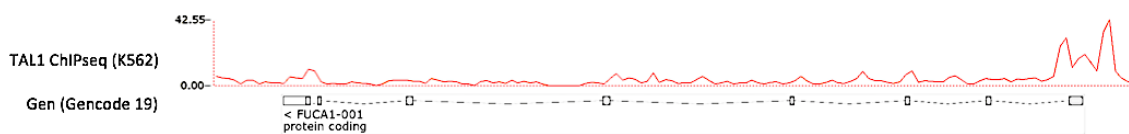


Abb. 76: Zielgen FUCA1
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.9. FRK

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Fyn-related kinase (FRK) eine +2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform 001 dar (Abb. 77). FRK stabilisiert Phosphatase and Tensin homolog deleted from Chromosome 10 (PTEN) durch Phosphorylierung und nachfolgendem Schutz vor Ubiquitinierung²⁶⁸. Die Überexpression verhindert die Proliferation und Invasion von Brustkrebszellen in vitro und in vivo, wohingegen der Knockdown normale Brustepithelien transformiert²⁶⁸. Weiterhin ist durch FRK die Phosphorylierung und Stabilisierung von Breast Cancer 1, early-onset (BRCA1)²⁶⁹, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) sowie die Hemmung des CyclinD1-CDK4-Komplexes und damit der Zellproliferation beschrieben²⁷⁰.

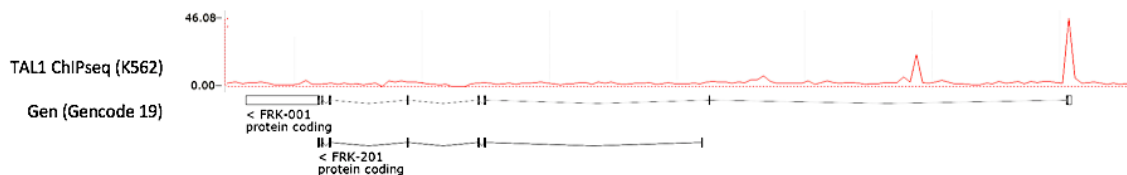


Abb. 77: Zielgen FRK

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.10. LTBP3

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Latent transforming growth factor beta binding protein 3 (LTBP3) eine +2,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 78). LTBP3 bildet einen Komplex mit Transforming Growth Factor beta (TGF- β)-Proteinen; deren Aktivierung erfordert die Entfernung von LTBP3 aus dem Komplex. LTBP3 ist im Rahmen der Tumormetastasierung am Gefäßeintritt von Tumorzellen sowie der Mikroarchitektur von Tumorgefäßen beteiligt²⁷¹.

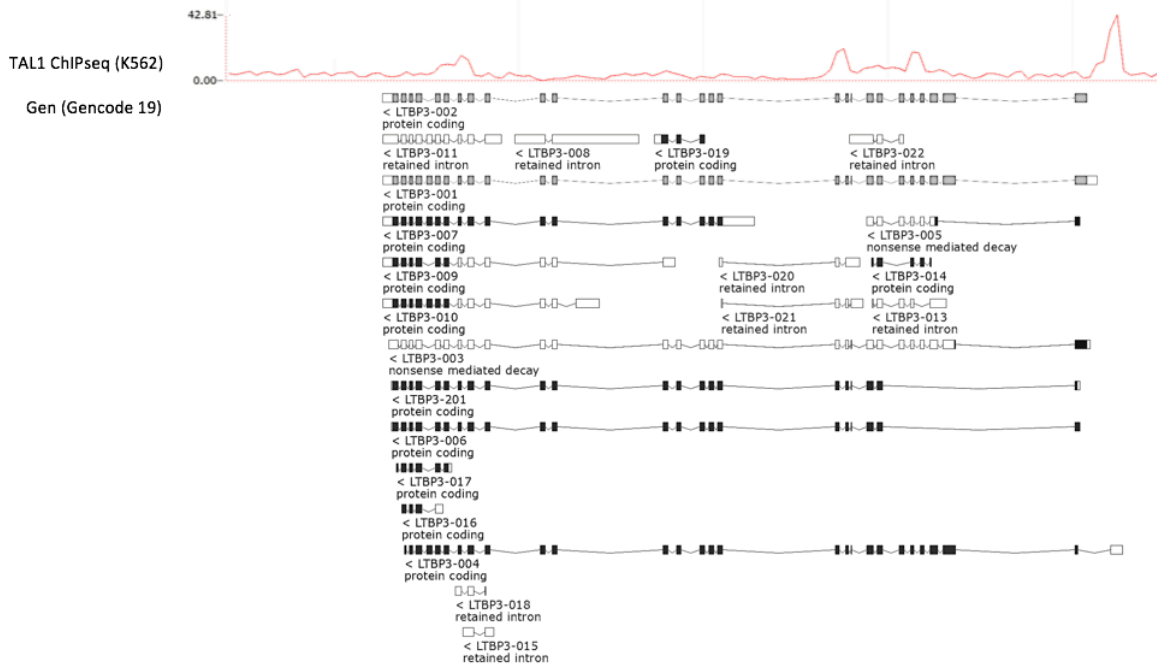


Abb. 78: Zielgen LTBP3
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.11. CMTM6

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 6 (CMTM6) eine +2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 79). CMTM6 reguliert die Membranexpression sowie das lysosomale Recycling von Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1): CMTM6 verbindet sich in der Zellmembran mit PD-L1, verlängert dessen Protein-Halbwertszeit und reduziert die Ubiquitinierung²⁷². Die Interaktion zwischen PD-L1 und seinem Rezeptor PD-1 führt zur T-Zell-Anergie und somit zur Selbst-, aber auch Tumortoleranz.

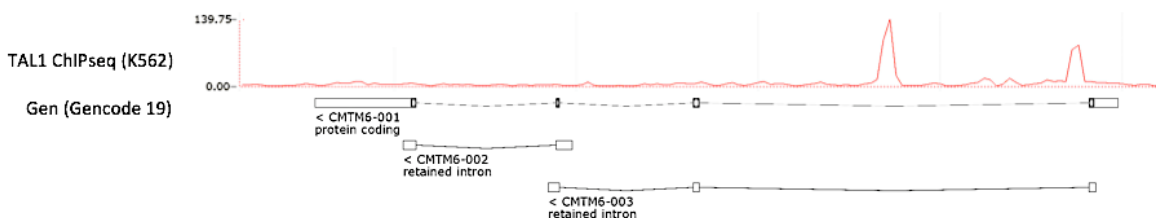


Abb. 79: Zielgen CMTM6
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.12. TBC1D10A

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei TBC1 domain family member 10A (TBC1D10A) eine +2,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 013 und 014 dar (Abb. 80). TBC1D10A reguliert über die Inhibition der kleinen GTPase Rab35 die Sezernation von Exosomen aus Oligodendrozyten²⁷³ und von Weibel-Palade-Körperchen aus Endothelzellen²⁷⁴.

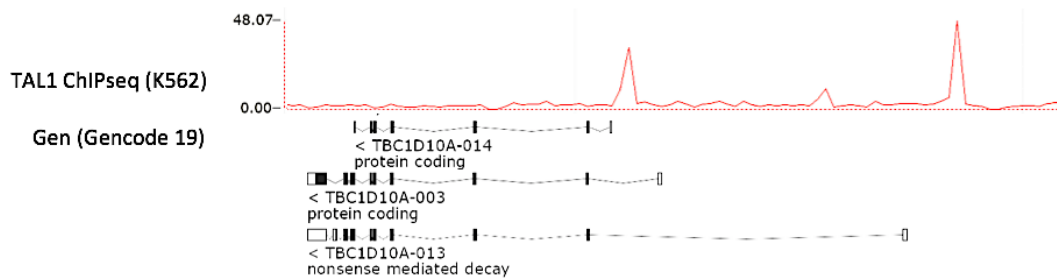


Abb. 80: Zielgen TBC1D10A

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.13. TOB2P1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Transducer of ERBB2, 2 pseudogene 1 (TOB2P1) eine +3,1-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 81). TOB2P1s Funktion ist aktuell noch unbekannt, allerdings wird eine Hypermethylierung oberhalb der TSS mit einem hohen AML-Risiko assoziiert²⁷⁵.

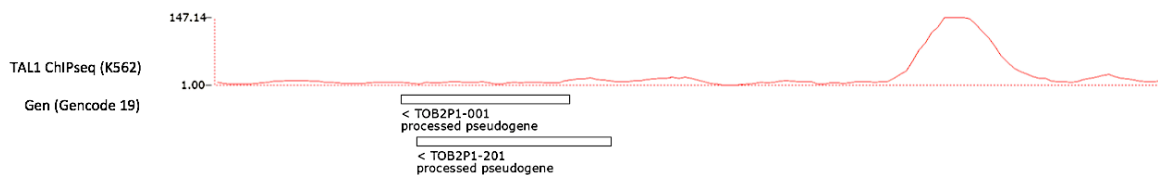


Abb. 81: Zielgen TOB2P1

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.14. BTG2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei B-cell translocation gene 2 (BTG2) eine +2,3-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 82). BTG2 wurde mehrfach im Screening auf Haupteffektoren der tumorsuppressiven Wirkung von p53 als wichtiger p53-induzierter Faktor identifiziert^{276,277}; die Herabregulation von BTG2 führt zur Heraufregulation der Cycline D1 und E1 sowie der Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (pRb)²⁷⁶. BTG2 wird bei zahlreichen Tumorerkrankungen herunterreguliert²⁷⁸. BTG2 interagiert mit Protein-arginin methyltransferase 1 (PRMT1)²⁷⁹ und führt zur verstärkten Demethylierung und Acetylierung an Histon H4²⁸⁰. Es bewirkt zusammen mit Retinoinensäure die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, gleichzeitig folgt auf Retinoinensäure die vermehrte Expression von BTG2, Heraufregulation von Retinoic acid receptor alpha (RAR α) und Differenzierungszunahme von hämatopoetischen- und AML-Zellen²⁸⁰. Weiterhin sind BTG2 und PRMT1 entscheidend an der prä-B-Zell-Differenzierung beteiligt und bewirken zusammen einen Proliferationsstop von BCR-ABL-transformierten prä-B-Zellen²⁸¹.

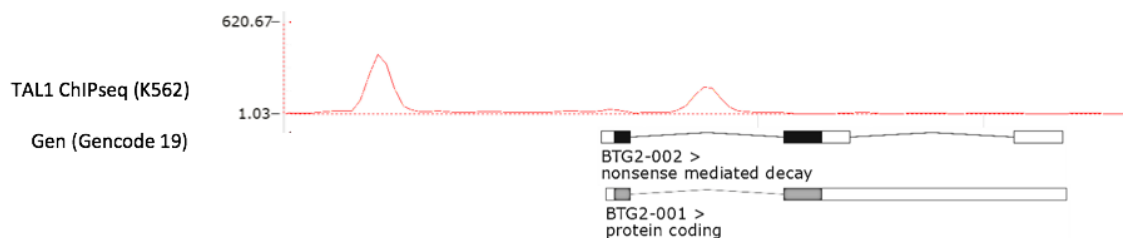


Abb. 82: Zielgen BTG2

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.15. BCL2A1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei BCL2 related protein A1 (BCL2A1) eine +3,2-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 83). BCL2A1 wird vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wo es anti-apoptotisch wirkt. So wird BCL2A1 während der prä-T-Zelldifferenzierung in der TCR-Zellselektion induziert und inhibiert nachfolgend Caspase-3²⁸². Induzierend sind u.a. GM-CSF und NF κ B, zudem wird bei verschiedenen malignen Neoplasien, u.a. Leukämien, eine verstärkte Expression und

Beteiligung an der Resistenz gegen Chemotherapeutika beobachtet²⁸³. Dies gilt auch im Rahmen der HTLV1-Infektion²⁸⁴.

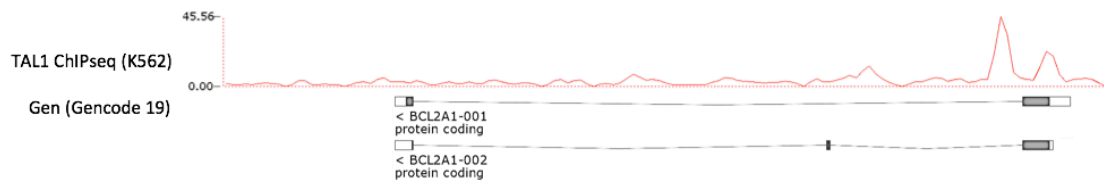


Abb. 83: Zielgen BCL2A
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.16. BMF

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei BCL2 modifying factor (BMF) eine +5,6-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 84). BMF ist ein in der Apoptose relevantes Gen mit Regulation durch p53^{285,286}. Infolge von Zellschädigung, Verlust von Zell-Zellkontakten oder Interferon-Gamma inhibiert es anti-apoptotische B-Cell Lymphoma 2 (BCL2)-Proteine²⁸⁷. Dieser pro-apoptotische Effekt wird über die BMF-Phosphorylierung durch die Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) aufgehoben²⁸⁸.

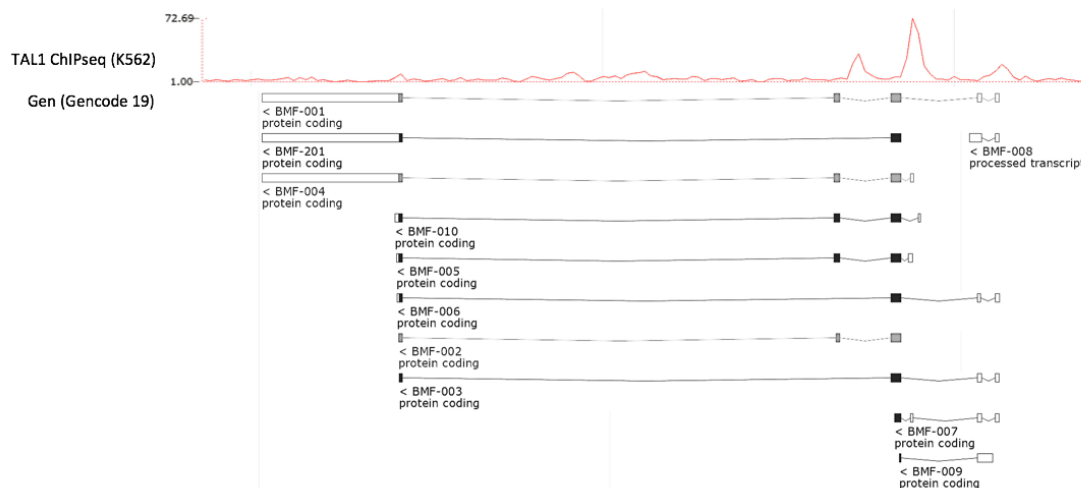


Abb. 84: Zielgen BMF
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.17. PTGS1

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1) eine +2,3-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform 201 dar (Abb. 85). PTGS1 (auch

bekannt als Cyclooxygenase 1, COX1) katalysiert die Transformation von Arachidonsäure zu Prostaglandin H2 (PGE2) sowie von Thromboxan A2 in Thrombozyten. PGE2 ist im Entzündungsgeschehen auf zahlreichen Ebenen beteiligt²⁸⁹. Zudem reguliert es die Angiogenese in Endothelzellen und ist möglicherweise an der Proliferation von Tumorzellen beteiligt. Im Mausmodell ist PGE2 an der Immunevasion beteiligt²⁹⁰.

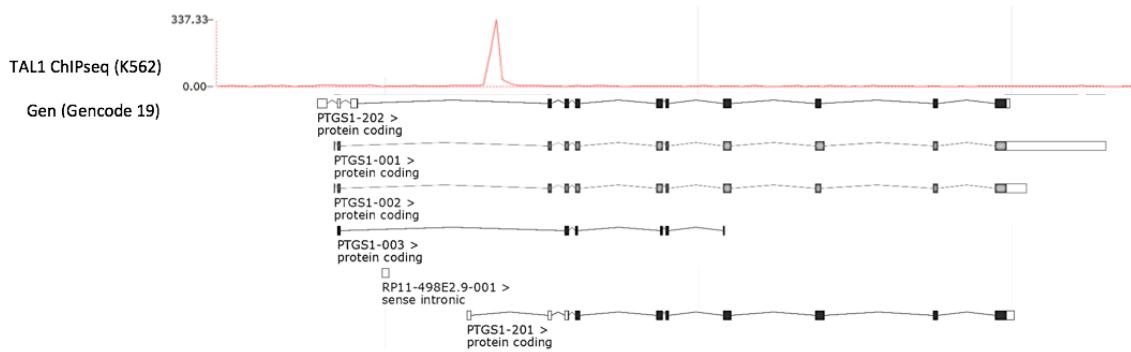


Abb. 85: Zielgen PTGS1
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.18. TPI1P2

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Triosephosphate isomerase 1 pseudogene 2 (TPI1P2) eine +2,4-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 86). TPI1P2s Funktion ist bislang unbekannt; es besteht eine GWAS-Assoziation zum Systemischen Lupus Erythematoses²⁹¹ und sporadischen ZNS-Aneurysmen²⁹².

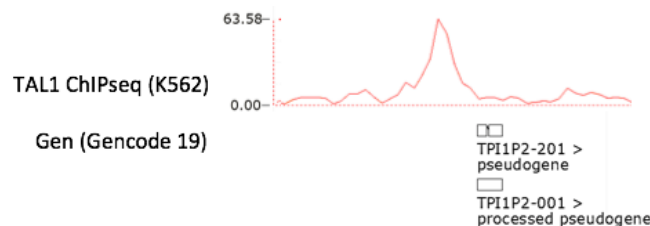


Abb. 86: Zielgen TPI1P2
 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.19. PLEC

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei Plectin (PLEC) eine +3,9-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoformen 009 und 013 dar (Abb. 87). PLEC dient der

Vernetzung von Intermediär- und Actinfilamenten²⁹³ und ist an Zell-Zell-Verbindungen (u.a. fokale Adhäsionen, Desmosomen) beteiligt²⁹⁴.

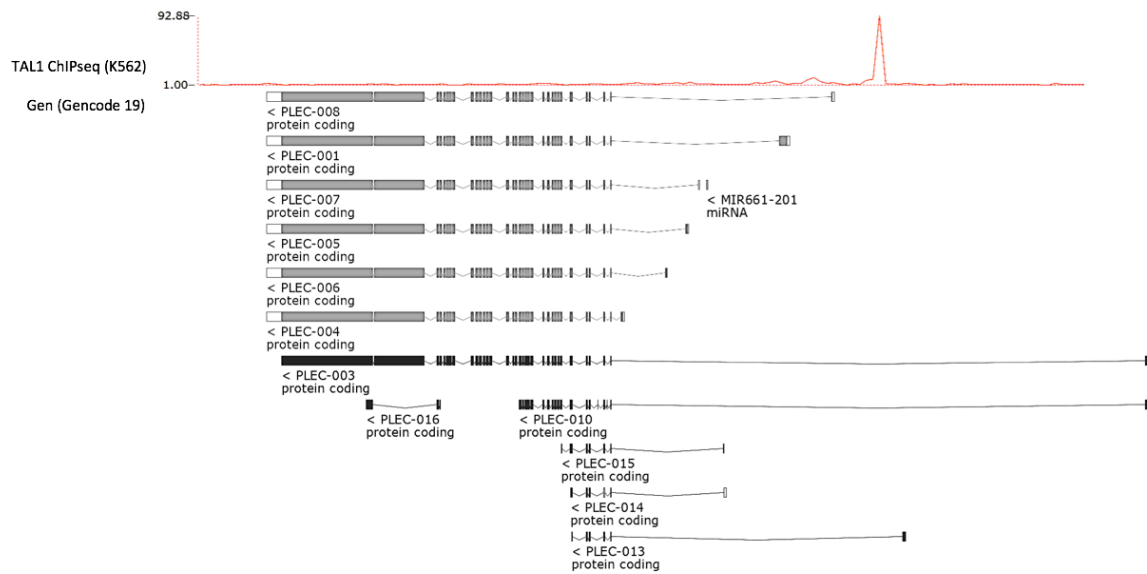


Abb. 87: Zielgen PLEC
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.2.1.2.12.20. PLA2G16

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei HRAS-like suppressor 3 (PLA2G16) eine +2,8-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 88). PLA2G16 codiert für HRAS-like suppressor 3 (HRASLS3), der einer der Hauptregulatoren der Adipozyten-Lipolyse sowie der Produktion von Arachidonsäure und insbesondere Prostaglandin E2 ist²⁹⁵. Der HRASLS3-Knockdown verhindert die terminale Differenzierung von Proerythroblasten²⁹⁶. Ferner ist die Expression von PLA2G16 in Tumoren mit vermehrter Aggressivität und Metastasierung verbunden^{297,298}.

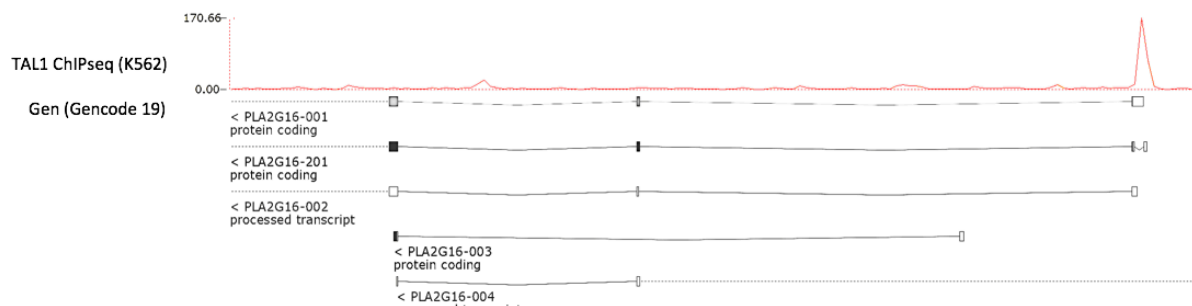


Abb. 88: Zielgen PLA2G16
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der Gencode 19-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

5.3. lncRNA

Nach TAL1-Knockdown stellten sich 5136 signifikant und 936 mehr als zweifach (2- bis 16-fach) veränderte lncRNA dar. Davon liess sich über Einbindung einer TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (Michael Snyder, Accession# ENCSR000EHB, <https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR000EHB>) bei 416 lncRNA-Genen eine TAL1-Peak im Bereich der TSS-Region (-2 kb, TSS, + 1 kb) nachweisen; diese sind jedoch bislang fast alle nicht funktionell untersucht.

Auswahlkriterien lncRNA	Anzahl
p, q < 0,05	5128
+ ≥ 2-facher Foldchange	936
+ TAL1-Bindung in der TSS-Region (-2kb, TSS, +1kb)	416

Tab. 13: Anzahl der lncRNA

5.3.1. Fold-Verteilung der lncRNA-Zielgene

Die entsprechend den o.g. Kriterien selektierten 416 lncRNA zeigten mehrheitlich einen bis 3-fachen Fold Change, 100 waren >4-fach hochreguliert, 12 >8. Insgesamt waren 681 lncRNA hochreguliert, 255 herunterreguliert.

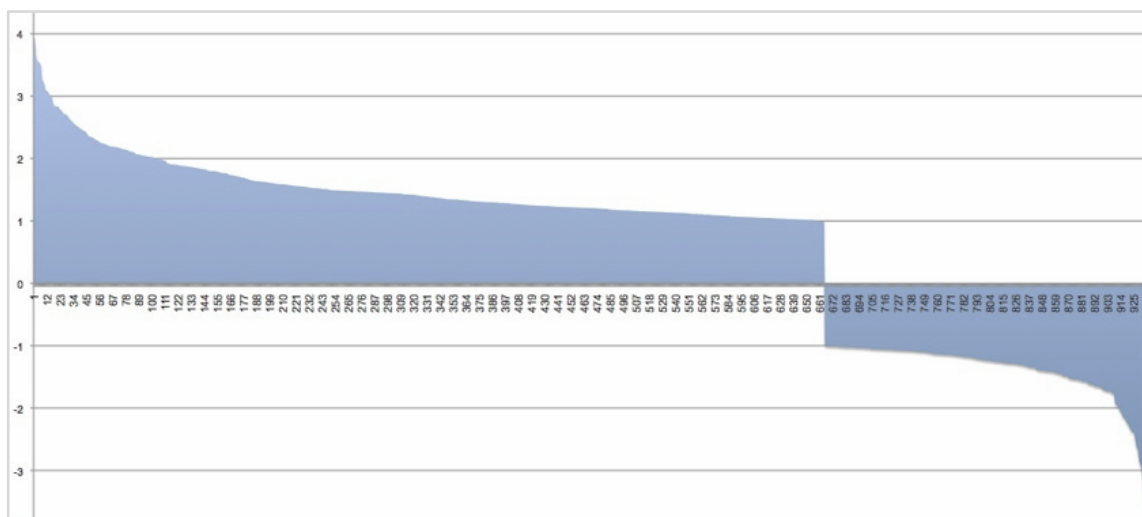


Abb. 89: \log_2 fold-Verteilung der lncRNA
(> 2-fach veränderte Transkripte mit TAL1-Bindung im Bereich der TSS)

5.3.1.1. Top 40 herunterregulierte lncRNA

NONCODE ID	Locus	FC	p-Wert	q-Wert
NONHSAG007755	11:16876435-17034889	-13,343452	0,000	0,001
NONHSAG041023	5:92745064-92921354	-10,421059	0,000	0,001
NONHSAG031149	20:3210316-3211206	-8,305805	0,005	0,025
NONHSAG001368	1:47689743-47697892	-7,8260808	0,000	0,001
NONHSAG029677	2:162280525-162696386	-7,4551635	0,000	0,002
NONHSAG040699	5:72740653-72742815	-7,1385942	0,001	0,005
NONHSAG041841	5:145422592-145428796	-6,3425808	0,009	0,040
NONHSAG049319	7:158415879-158416141	-6,217868	0,009	0,040
NONHSAG006528	10:93565802-93567280	-5,7611627	0,000	0,001
NONHSAG027289	2:26901086-26909841	-5,3522296	0,009	0,039
NONHSAG038916	4:137717876-138133953	-5,2109268	0,002	0,013
NONHSAG000487	1:17007544-17018804	-5,1932944	0,000	0,001
NONHSAG050736	8:92968729-92970161	-5,0592376	0,005	0,024
NONHSAG041617	5:135148255-135162271	-4,9952608	0,002	0,010
NONHSAG032086	20:54941963-54942210	-4,7818206	0,000	0,001
NONHSAG054516	X:52541052-52545988	-4,7330495	0,005	0,026
NONHSAG019632	16:61089302-61089868	-4,6265283	0,000	0,001
NONHSAG036612	3:169201458-169201868	-4,4834521	0,000	0,001
NONHSAG028629	2:97584842-97617672	-4,4592157	0,000	0,001
NONHSAG010211	12:3320774-3321096	-4,3645714	0,002	0,012
NONHSAG018783	16:19365543-19405174	-4,1859933	0,000	0,001
NONHSAG013019	13:24982294-25171814	-4,1445917	0,012	0,047
NONHSAG017696	15:84278021-84287394	-3,9708559	0,000	0,001
NONHSAG036391	3:150452162-150456772	-3,9163508	0,005	0,023
NONHSAG021090	17:19015312-19015949	-3,8395041	0,000	0,001
NONHSAG023384	18:12031120-12032180	-3,8185105	0,008	0,037
NONHSAG001367	1:47670391-47672900	-3,4365716	0,000	0,001
NONHSAG017449	15:75315940-75336067	-3,3988578	0,005	0,024
NONHSAG005323	10:17275323-17276832	-3,3800158	0,000	0,001
NONHSAG017185	15:65526817-65540781	-3,3269035	0,000	0,002
NONHSAG007662	11:11373972-11374854	-3,3171632	0,000	0,001
NONHSAG041941	5:149929975-149930461	-3,3102955	0,010	0,042
NONHSAG007194	10:132102127- 132102815	-3,310066	0,000	0,001
NONHSAG054259	X:39226538-39251028	-3,3060533	0,006	0,027
NONHSAG021338	17:27188089-27188984	-3,2718123	0,000	0,001
NONHSAG051651	9:2763772-2771317	-3,2683897	0,001	0,008
NONHSAG027639	2:45392008-45550434	-3,2147577	0,000	0,002

NONHSAG005974	10:61412514-61413199	-3,1901848	0,001	0,004
NONHSAG004040	1:204839731-204914160	-3,1676216	0,000	0,001
NONHSAG018646, NONHSAG018647	16:12996735-13005504	-3,1485989	0,000	0,001
NONHSAG049771	8:23536206-23540450	-3,14633	0,000	0,001

Tab. 14: Top 40 herunterregulierte lncRNA

5.3.1.2. Top 40 hochregulierte lncRNA

NONCODE ID	Locus	FC	p-Wert	q-Wert
NONHSAG004695	1:235108773-235116551	15,73	0,000	0,002
NONHSAG042711	6:2917127-2956709	14,81	0,001	0,007
NONHSAG044067	6:68750163-68819883	12,38	0,003	0,015
NONHSAG004808	1:241695637-241725583	11,90	0,001	0,004
NONHSAG025624	19:36398195-36399197	11,73	0,005	0,025
NONHSAG035799	3:115521221-115524018	11,58	0,000	0,001
NONHSAG017587	15:79290688-79312932	11,28	0,002	0,011
NONHSAG038815	4:124326622-124448998	9,52	0,000	0,002
NONHSAG041546	5:132298732-132299302	9,45	0,004	0,022
NONHSAG003220	1:160639937-160653698	9,04	0,000	0,001
NONHSAG019709	16:67038861-67043661	8,58	0,000	0,001
NONHSAG022076	17:46537490-46543402	8,46	0,000	0,001
NONHSAG000660	1:23878412-23881254	8,40	0,006	0,027
NONHSAG012496	12:120518484-120527831	8,19	0,010	0,042
NONHSAG052727	9:89623365-89657041	8,07	0,000	0,001
NONHSAG006139	10:72359687-72361820	8,03	0,000	0,002
NONHSAG013479	13:48963705-49018803	7,52	0,001	0,007
NONHSAG036724	3:177159708-177470492	7,19	0,002	0,010
NONHSAG014454	14:22237067-23016567	7,16	0,000	0,001
NONHSAG045116	6:149539061-149565208	7,13	0,013	0,049
NONHSAG011121	12:50345294-50356707	7,12	0,000	0,001
NONHSAG015766	14:94405680-94443085	7,11	0,005	0,024
NONHSAG038314	4:82380136-82965397	6,86	0,003	0,016
NONHSAG016856	15:50189631-50209473	6,86	0,000	0,001
NONHSAG047009	7:17029803-17061251	6,73	0,002	0,014
NONHSAG041761	5:140706071-140707696	6,59	0,002	0,012
NONHSAG017294	15:70127572-70135459	6,55	0,006	0,027
NONHSAG024044	18:60795444-60829102	6,54	0,000	0,001
NONHSAG034566	3:17784427-17787157	6,47	0,010	0,041
NONHSAG024160	18:71740603-71767303	6,38	0,005	0,024
NONHSAG004697	1:235143558-235144503	6,19	0,000	0,002
NONHSAG011858	12:89175622-89178025	6,17	0,000	0,001

NONHSAG047571	7:50526139-50527382	6,02	0,000	0,003
NONHSAG018951	16:26596075-26606134	6,01	0,003	0,016
NONHSAG012897	13:20133177-20142960	5,87	0,010	0,041
NONHSAG016832	15:49164209-49169478	5,84	0,002	0,012
NONHSAG041001	5:90575896-90578519	5,74	0,004	0,022
NONHSAG053589	9:132337687-132346835	5,72	0,000	0,001
NONHSAG034317	3:4938492-5021646	5,66	0,000	0,001
NONHSAG017456	15:75517501-75519599	5,59	0,000	0,001
NONHSAG031057	2:242762410-242763015	5,53	0,002	0,013

Tab. 15: Top 40 hochregulierte lncRNA

5.3.1.3. GO Analyse lncRNA

Klar dominierend bei den lncRNA sind anhand der Lagebeziehung GO-Terme für die Regulierung von Zellwachstum, Komplementsystem, Akute-Phase-Reaktion und u.a. der Interferon-Signalweg und Telomer-Maintenance.

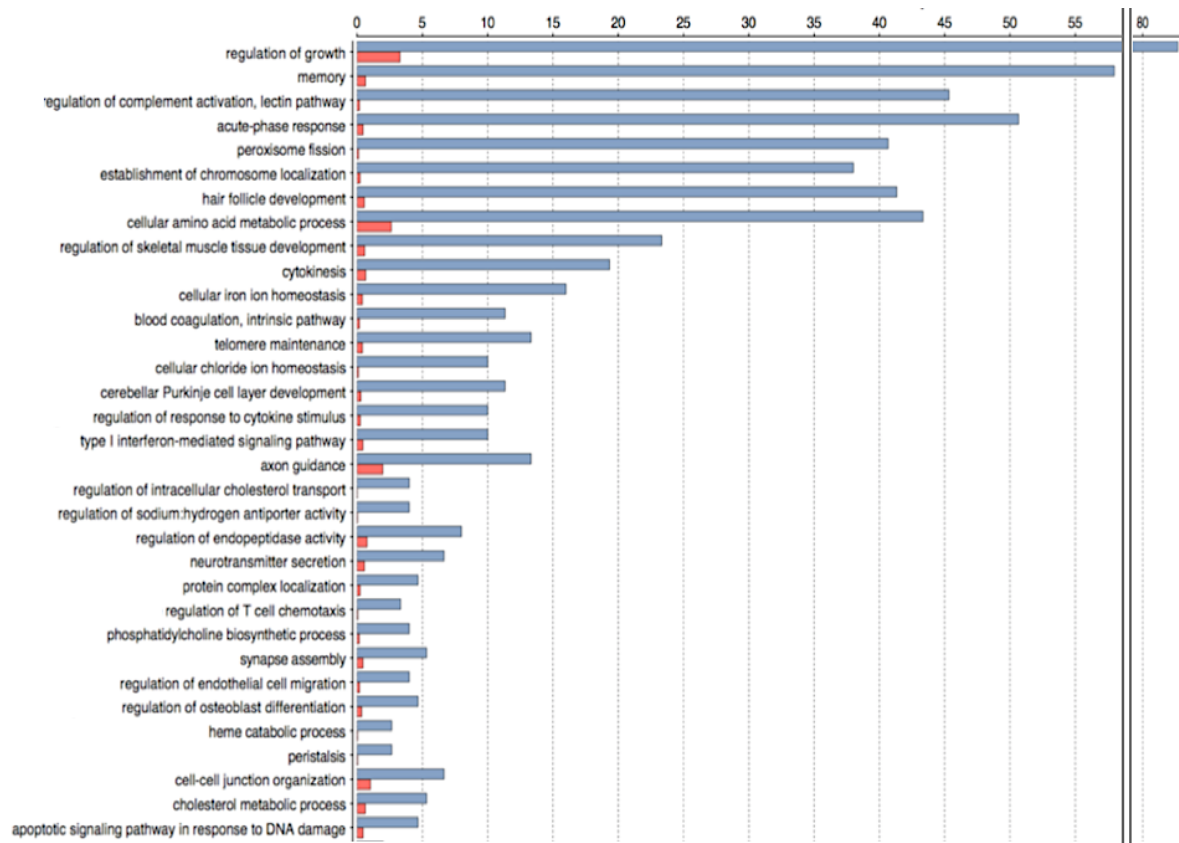


Abb. 90: GO-Darstellung lncRNA

(Programm BLAST2GO, die Abszisse zeigt den Prozentsatz der zugeordneten Transkripte (blau der RNAseq-Datensatz, rot ein Testdatensatz zur Normalisierung)

5.3.2. Beispiele der identifizierten lncRNA-Zielgene

Nachfolgend werden einige lncRNA beispielhaft dargestellt, insbesondere die maximal hoch- bzw. herunterregulierten lncRNA.

5.3.2.1. NONHSAG004695

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG004695 eine +15,7-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellen sich prominente Peaks im Promotorbereich der Isoformen dar (Abb. 93). Die im NONHSAG004695-Locus gelegenen lncRNA sind über einige Spezies konserviert und werden beim Menschen besonders in Leukozyten exprimiert, sind jedoch bislang funktionell nicht untersucht. Anti-sense liegt die bei zahlreichen Tumorerkrankungen epigenetisch hypermethylierte lincRNA RP11-443B7.3-001, die in einer Netzwerkanalyse besonders mit TP53 und EGFR assoziiert wird²⁹⁹.

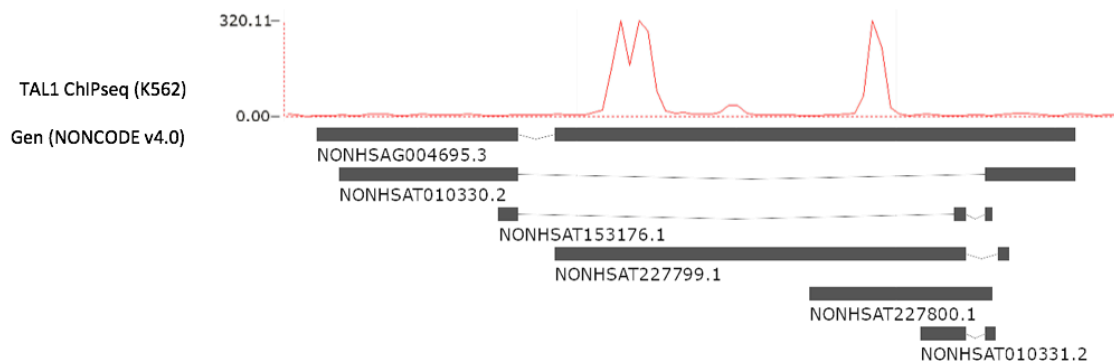


Abb. 91: Zielgen: NONHSAG004695

Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

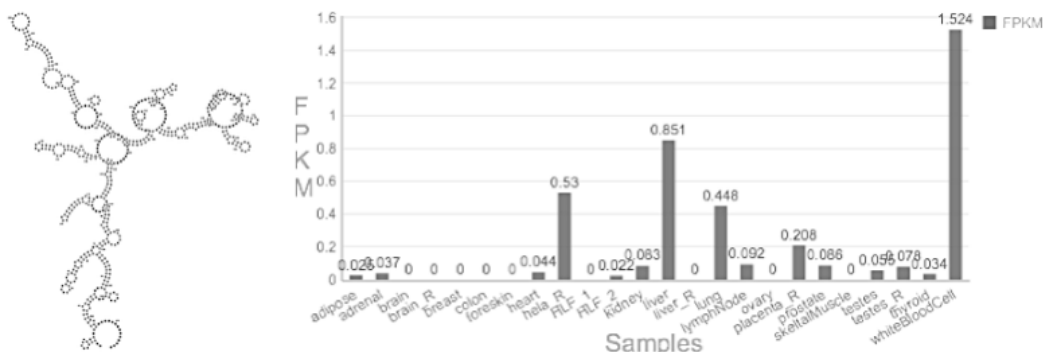


Abb. 92: NONHSAG004695 - Struktur und Expression mit maximaler Expression in Leukozyten (Expression in normalisierten Reads, FPKM, Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.2. NONHSAG003220

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG003220 eine +9-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich der Isoform NONHSAT149941.1 dar (Abb. 95). NONHSAG003220 liegt anti-sense und damit potentiell aktiv zu CD48, dass bei der AML durch AML-ETO unter Beteiligung von HDAC1 herunterreguliert wird; infolgedessen können NK-Zellen die Tumorzellen nicht mehr erkennen³⁰⁰. Weiterhin ist CD48 bei der Interferon-Gamma-Produktion sowie der Regulation von long-term quiescent HSC beteiligt³⁰¹. Für die im NONHSAG003220-Locus enthaltene lncRNA RP11-404F10.2 wird eine Herunterregulation beim Multiplen Myelom beschrieben³⁰². Die Expression ist ebenfalls in Leukozyten besonders prominent.

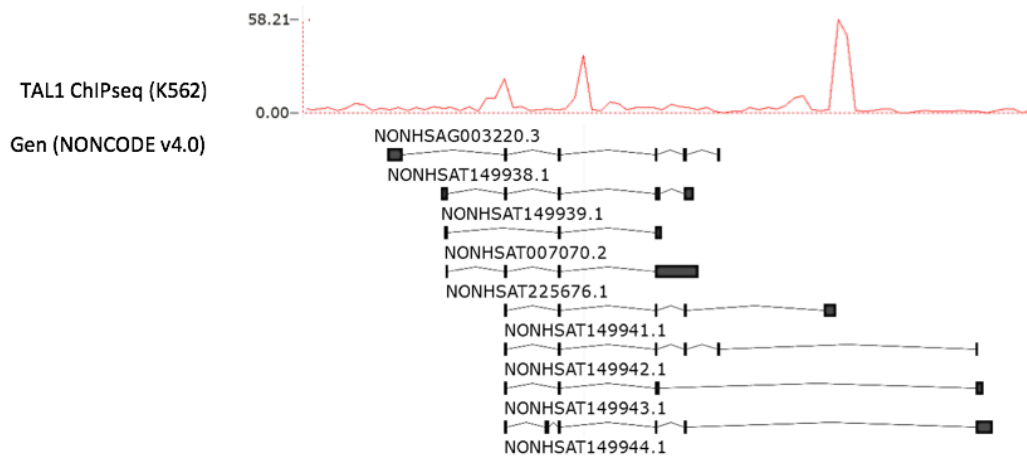


Abb. 93: Zielgen NONHSAG003220
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

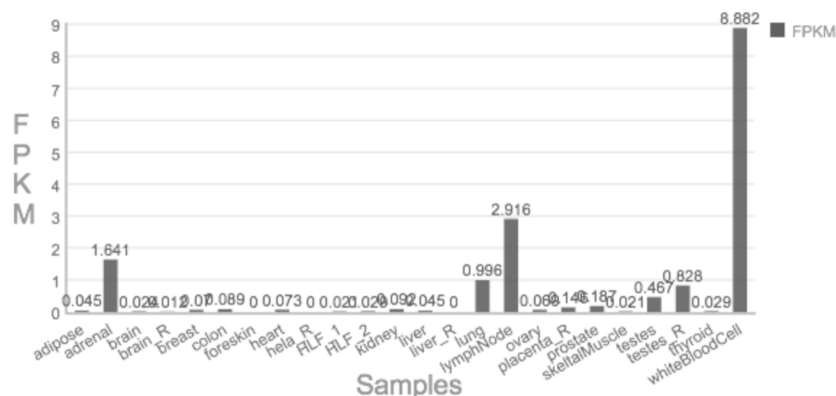


Abb. 94: NONHSAG003220: Expression
mit maximaler Expression in Leukozyten (Expression in normalisierten Reads (FPKM),
Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.3. NONHSAG031607

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG031607 eine +4,92-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 97). Die noch nicht charakterisierte lncRNA NONHSAG031607 liegt anti-sense zu C20orf112 (auch NOL4L genannt), einem kürzlich entdeckten AML-Translokationspartner von RUNX1³⁰³. Die Funktion von C20orf112 ist ebenfalls noch unbekannt³⁰⁴, die Expression dominant leukozytär.

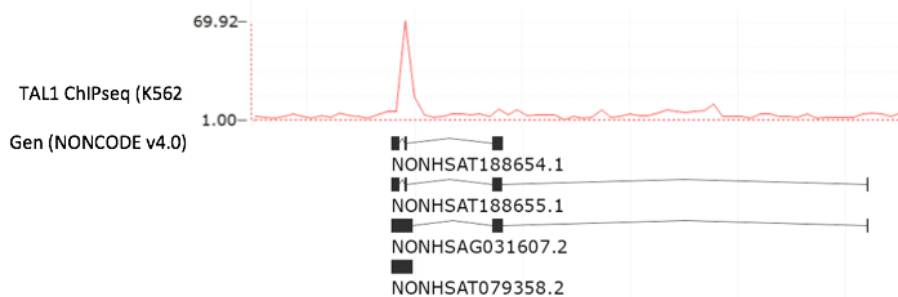


Abb. 95: Zielgen NONHSAG031607
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

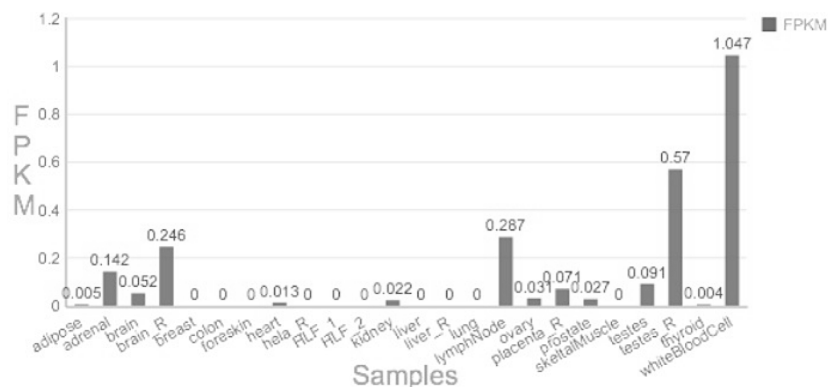


Abb. 96: NONHSAG031607: Expression
mit maximaler Expression (NONCODE RNAseq) in Leukozyten (Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.4. NONHSAG001514

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG001514 eine +4,72-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 99). NONHSAG001514 (auch lincRNA RP11-117D22.2-001 genannt) ist noch nicht charakterisiert. Bekannt ist eine Hochregulierung

in Zellen einer akuten lymphocytischen Leukämie nach ETV6-Überexpression,³⁰⁵ das Expressionmuster nach NONCODE ist ebenfalls dominant leukozytär.

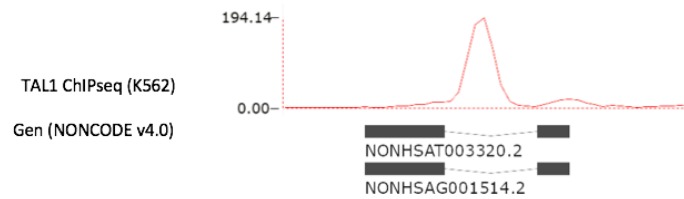


Abb. 97: Zielgen NONHSAG001514
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

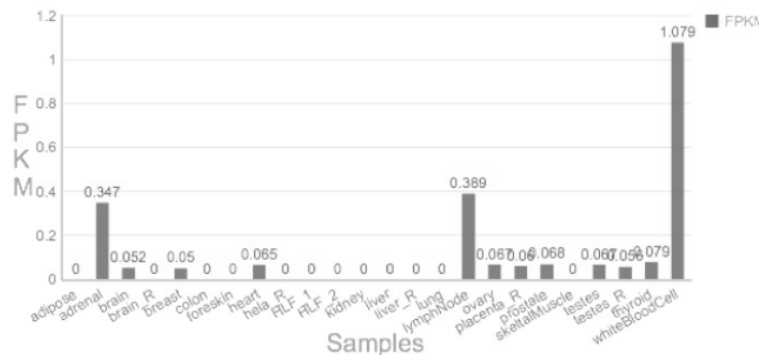


Abb. 98: NONHSAG001514: Expression
mit maximaler Expression (NONCODE RNAseq) in Leukozyten (Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.5. NONHSAG003033, NONHSAG003034

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG003033 und -34 eine +2,99 bzw. +2,77-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich von NONHSAG003034 dar (Abb. 101). NONHSAG003033 und -34 werden innerhalb des Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 (PBXIP1)-Locus codiert. Die Funktion ist bislang unbekannt, die Expression heterogen mit physiologisch offenbar fehlender (NONHSAG003034) bzw. geringer (NONHSAG003033) Leukozyten-Beteiligung.



Abb. 99: Zielgene NONHSAG003033, NONHSAG003034
Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten).

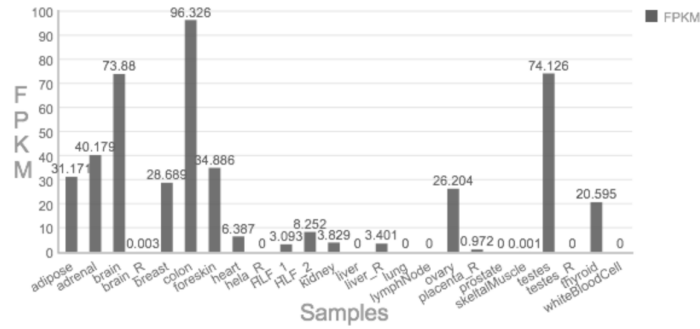


Abb. 100: NONHSAG003034 Expression mit heterogenem Expressionsmuster (Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

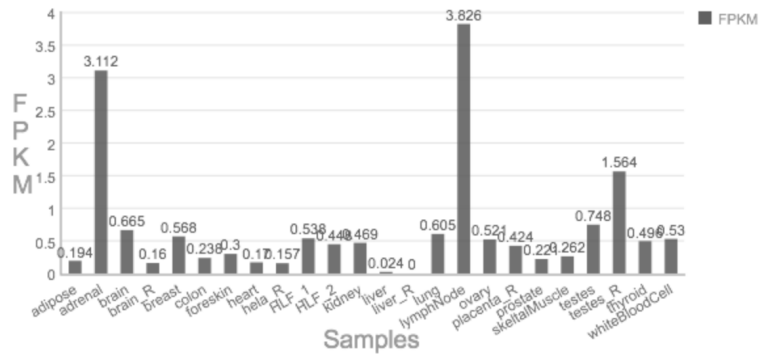


Abb. 101: NONHSAG003033 Expression mit heterogenem Expressionsmuster (Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.6. NONHSAG050736

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG050736 eine -5,03-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich von RUNX1T1 dar (Abb. 104). NONHSAG050736 wird innerhalb des Runt-related transcription factor 1; translocated to 1 (RUNX1T1, auch bekannt als ETO)-Locus codiert. Die Funktion ist noch unbekannt, die Expression heterogen, physiologisch offenbar ohne Leukozytenbeteiligung (NONCODE-Daten).



Abb. 102: Zielgen NONHSAG050736 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot), die codierenden Transkripte (Gencode 19) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten)

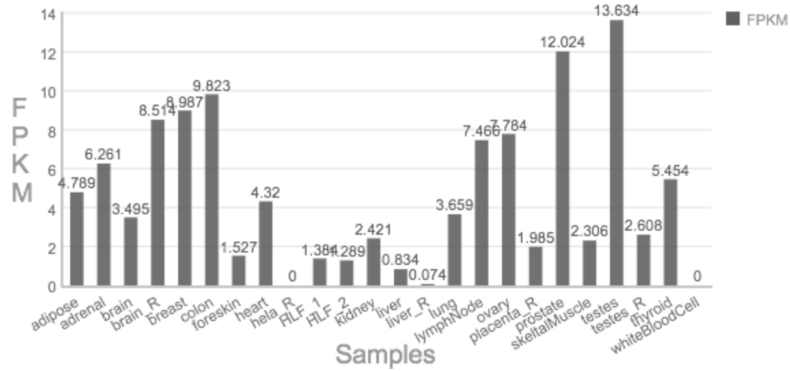


Abb. 103: NONHSAG050763 Expression mit heterogenem Expressionsmuster (Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

5.3.2.7. NONHSAG001368

Nach TAL1-Knockdown zeigt sich bei NONHSAG001368 eine -7,84-fache Expressionsveränderung; in der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen stellt sich ein relevanter Peak im Promotorbereich dar (Abb. 106). NONHSAG001368 wird sense zu proteinogenen Sequenzen im TAL1-Locus codiert und korreliert zu prozessierten Transkripten in der ENSEMBL-Annotation. Eine prominente Expression in Exosomen aus Blut gesunder Probanden ist zu verzeichnen (NONCODE-Daten).

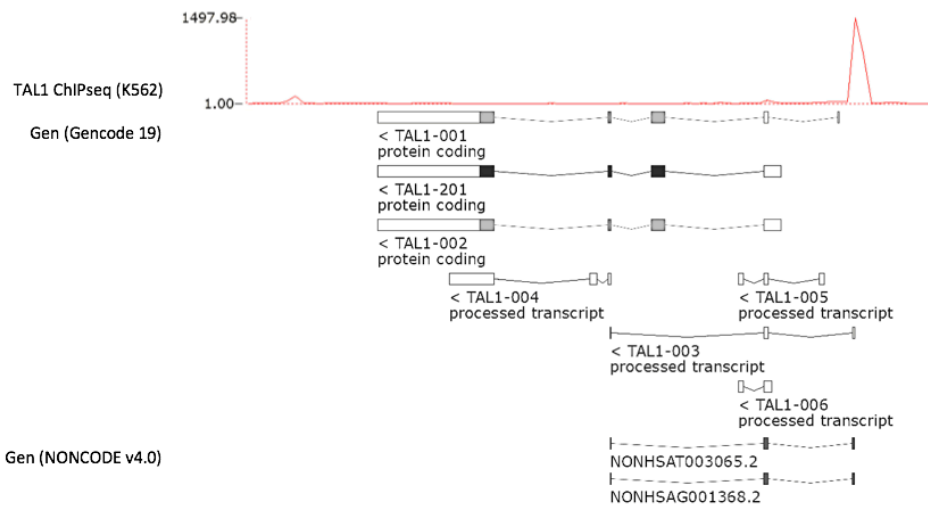


Abb. 104: Zielgen NONHSAG001368 Dargestellt ist der Track der TAL1-ChIPseq in K562-Zellen (rot), die codierenden Transkripte (Gencode 19) sowie das Zielgen in der NONCODE v4.0-Annotation (Grafik erstellt aus Ensembl Genome Browser-Daten)

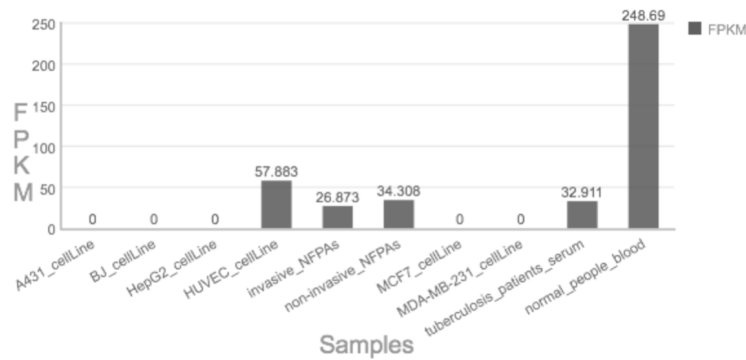


Abb. 105: NONHSAG001368: Expression in Exosomen
(Expression in normalisierten Reads (FPKM), Datenbank: noncode.org – v4.0)

6. Diskussion

Ziel war die Identifikation von neuen Zielgenen des TF TAL1, der entscheidend an physiologischer und pathologisch veränderter Hämatopoese beteiligt ist. So ist seine Gen- und Promotorstruktur bei ca. 20-30% der T-ALL verändert⁵⁴⁻⁵⁸, auch findet sich eine gesteigerte Expression bei etwa 60% der pädiatrischen und ca. 45% der adulten T-ALL^{59,60}. Physiologisch ist TAL1 in der Hämatopoese unverzichtbar. Murine TAL1 -/- Embryos sind schon in der frühen Embryonalperiode aufgrund des vollständigen Fehlens aller Blutzellen nicht mehr überlebensfähig⁶¹⁻⁶³. Weiterhin spielt der TF in der adulten Megakaryopoese und Erythropoese eine wichtige Rolle⁶⁴. Die Identifikation von neuen Zielgenen war dementsprechend sowohl aus klinischen Gründen, als auch zum Verständnis der hämatopoetischen Funktionen, wie z.B. in der Erythropoese, bedeutsam. Durch die angewendeten Methoden wurden zahlreiche neue Erkenntnisse zur Rolle von TAL1 in K562-Zellen gewonnen.

6.1. Ergebnisse

Zunächst erfolgte nach lentiviral vermitteltem TAL1-Knockdown in Erythroleukämie-Zellen (K562-Zellen) eine globale Transkriptomanalyse (RNAseq). K562-Zellen exprimieren den TF in besonderem Umfang und waren damit für die Untersuchung von TAL1-bedingten Veränderungen der Genexpression und Identifizierung von Zielgenen gut geeignet.

Nach TAL1-Knockdown stellten sich 3205 signifikant veränderte codierende Transkripte (842 grösser als zweifach) sowie 5128 signifikant veränderte lncRNA-Transkripte dar (>zweifach: 936). Codierende und nicht-codierende Transkripte wurden nachfolgend

über die Integration einer TAL1-ChIPseq in K562 (Snyder et al., ENCODE Project ID: ENCSR000EHB) auf TAL1-Bindung im Bereich der TSS untersucht sowie einer Signalwegs-/GO-Analyse unterzogen. So gelang die Identifizierung von expressionsveränderten TAL1-Zielgenen in K562-Zellen im Unterschied zum bisherigen Erkenntnisstand, der nur die Präsenz des TF an regulatorischen Elementen zeigte (ENCODE ChIPseq in K562, s.o.).

6.2. Hanahan, Weinberg und TAL1-Zielgene

Zur Frage eines möglichen Beitrags der identifizierten Zielgene zur Onkogenese wurde diese in den Kontext der Hanahan'schen Prinzipien (vgl. Einleitung) gestellt. Eine weitere Diskussion der Zielgene erfolgte im Hinblick auf eine (potentielle) Relevanz in der Erythropoese und Osteogenese.

6.2.1. Zielgene mit Beitrag zur unabhängigen Proliferation?

Die unabhängige Zellproliferation ist erstes Element der Hanahan'schen Prinzipien. Hierzu assoziierte neue TAL1-Zielgene zeigen sich mit HEMGN, AHI1, MYC, SLC7A8, EGFL7, PTGS1, POU3F2 und PLA2G16.

HEMGN (-3,6-fach) wird spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist hier an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt¹⁵²; in CD34+ Zellen führt die Überexpression zum raschen Eintritt in den Zellzyklus¹⁵⁵, der Knockdown in K562 schränkt das Wachstum ein¹⁵³. HEMGN ist bislang nicht als TAL1-Zielgen bekannt, allerdings entspricht das Zielgen dem TF-Funktionsmuster in der Erythropoese: der Knockdown von HEMGN in K562 reduziert die Proliferation und verstärkt die erythrozytäre Differenzierung¹⁵³.

Als weiterer proliferationsrelevantes Zielgen wurde **AHI1** (-2,2-fach) identifiziert. AHI1 interagiert in K562-Zellen mit BCR/ABL, führt bei Überexpression zu verstärkter bzw. bei Knockdown zu verminderter Proliferation und kann die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib zusammen mit IL3 komplett aufheben¹⁶². AHI1 ist ebenfalls noch nicht als TAL1-Zielgen bekannt; dies gilt auch für TAL1-Effekte bei Philadelphia-Chromosom positiven Patienten. Beschrieben wird jedoch eine Beteiligung von TAL1 bei der erythrozytären Differenzierung von CML-Blasten³⁴⁸. **MYC** (-2,1-fach) wird in den meisten Tumorzellen sowie therapieresistenten Leukämiezellen stark exprimiert,

erhöht deren Proliferation und verhindert ihre Differenzierung¹⁶⁵. MYC wurde 2010 ohne nähere Angaben als funktionales TAL1-Zielgen in Leberzellen beschrieben³⁴⁹, 2014 als TAL1-reguliert bei der pädiatrischen T-ALL charakterisiert³⁵¹ und mit den vorliegenden Ergebnissen auch als Zielgen in K562-Zellen identifiziert. Ebenfalls proliferationsfördernd ist der L-Typ-Aminosäuretransporter **SLC7A8** (-2,4-fach), der als Aktivator des wachstumsfördernden mTORC1-Signalwegs wirkt¹⁷³. Die Beeinflussung des mTOR-Signalwegs durch TAL1 über die Regulation von DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4 alias REDD1) ist bereits bekannt³⁵⁰. Eine Erhöhung des DDIT4-Spiegels in HSC führt vergleichbar einer Rapamycin-Behandlung zur Wachstumshemmung³⁵⁰. DDIT4 stellt sich im vorliegenden Datensatz auch als TAL1-Zielgen in K562-Zellen dar, zeigt sich jedoch unter dem auswertungsbedingt üblicherweise gewählten Cutoff der Expressionsveränderung (1,80-fach hochreguliert bei Cutoff mindestens 2-fach). Bei SLC7A8 handelt es sich um ein bislang noch nicht beschriebenes TAL1-Zielgen.

Verstärkte Zellproliferation wird auch durch **EGFL7** (-4,6-fach) beobachtet; die erhöhte Expression ist in Tumorzellen mit vermehrter Zellproliferation und schlechter Prognose assoziiert¹⁸⁵.

Als TAL1-Zielgen zeigte sich auch die von **PTGS1** (+2,3-fach) codierte COX1. Diese wird zeitgleich zur Zelldifferenzierung induziert³⁰⁸, jedoch auch in unterschiedlichen Tumorentitäten überexprimiert, wo eine selektive COX1-Inhibition zur reduzierten Proliferation führt³⁵⁶.

POU3F2 (-3,1-fach) ist ein TF, der in Tumorzellen (Gliom/ZNS) stark exprimiert wird und zur vermehrten Zellproliferation führt, die über den MAPK-Signalweg vermittelt wird³⁰⁶. Ebenfalls über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs wirkt **PLA2G16** (+2,8-fach) bei Überexpression in Tumorzellen proliferationssteigernd³⁰⁷. Eine Beteiligung TAL1s im MAPK-Signalweg wurde besonders in Endothelzellen unter Hypoxie³⁵²⁻³⁵³ sowie in der Zellzyklus-Regulation von prä-T-Zellen beschrieben³⁵⁴.

6.2.2. Zielgene mit Beitrag zu fehlender Proliferationshemmung?

Zusätzlich zur unabhängigen Proliferation ist in der Onkogenese ein Antagonismus der Proliferationshemmung notwendig. Hier zeigten sich YPEL3, UBE2F, BTG2, RARRES3, NR4A2, FRK, UBE2F und SOST als neuen TAL1-Zielgene.

YPEL3 (+2,6-fach) wurde in Myeloblasten als proliferationshemmendes Protein identifiziert; es wird als Tumorsuppressor und p53-Zielgen beschrieben^{251,252}. YPEL3 war bislang nicht als TAL1-Zielgen bekannt.

Gleiches gilt für **BTG2** (+2,3-fach). Hier führt die Herabregulation zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung von pRb sowie zum Zellzykluseintritt²⁷⁶, allerdings bewirkt BTG2 zusammen mit Retinoinensäure die Differenzierung von hämatopoetischen- und AML-Zellen²⁸⁰, zusammen mit der Arginin-Methyltransferase PRMT1 einen Proliferationsstopp von BCR-ABL-transformierten Zellen²⁸¹. Dabei ist BCR entsprechend der Encode-ChIPseq TAL1-Zielgen in K562-Zellen. Auch zu PRMT1 besteht bereits eine TAL-Assoziation, Genprodukte wurde als Hypoxie-Sensor in hämatopoetischen Zellen beschrieben und sind an der Regulation von TAL1-Isoformen beteiligt³⁵⁵.

Neben YPEL3 ist **RARRES3** (-2,8-fach) ein weiteres p53-Zielgen¹⁸⁶ und agiert über die Acetylierung von Mitgliedern des Wnt/ β -catenin-Signalwegs als Proliferationshemmer¹⁸⁷ und Tumorsuppressor in verschiedenen Krebszellen¹⁸⁸. Ein Bezug von TAL1 zum Wnt-Signalweg ist aus TAL1 (-/-)-Endothelzellen bekannt, wo aus dem Knockout die Hochregulation von Wnt-Antagonisten folgt³⁵⁷. RARRES3 stellt sich ebenfalls als bislang nicht beschriebenes TAL1-Zielgen dar.

Gleiches gilt für **NR4A2** (+4,5-fach). NR4A2 wird von externen Stimuli wie Cytokinen induziert und hebt bei Überexpression eine p53-vermittelte Hemmung der Zellproliferation auf²⁰⁹.

Weiteres neues Zielgen ist **FRK** (+2,2-fach), dessen Überexpression die Proliferation und Invasion von Brustkrebszellen in vitro und in vivo verhindert, wohingegen der Knockdown normale Brustepithelien transformiert²⁶⁸. Weiterhin ist durch FRK u.a. die Hemmung des CyclinD1-CDK4-Komplexes und damit der Zellproliferation beschrieben²⁷⁰.

Bislang nicht als TAL1-Zielgen beschrieben ist auch **UBE2F** (-2,2-fach), einem E2-Enzym im Neddylierungssystem (ähnlich der Ubiquitinierung). UBE2F neddyliert den Proliferationshemmer Cullin-5, woraus ein verstärktes Zellwachstum resultiert; hingegen folgt aus dem UBE2F-Knockdown die Apoptose von Zellen eines Lungen-Ca²⁰²

Der Wnt-Inhibitor **SOST** (+6,3-fach) wird bei der Behandlung von K562-Zellen mit Imatinib herunterreguliert²²⁸ und ist bei Brustkrebszellen bei Herunterregulation mit verminderter Proliferation verbunden ist³⁰⁹, kann jedoch im anti-proliferativem Umfeld

auch pro-onkogene Wirkungen entfalten²²⁷. Eine Heraufregulation von SOST wurde auch nach TAL1-Knockout in Endothelzellen beobachtet³⁵⁷.

Insgesamt ergibt sich zu TAL1 und Proliferationshemmung somit ein gemischtes Bild von teils proliferationsfördernden Effekten (positive Regulation von YPEL3, BTG2, FRK und UBE2F, negative von RARRES).

6.2.3. Zielgene mit Beitrag zur Verhinderung der Apoptose?

Zu den Prinzipien der Krebsentstehung zählt auch die Evasion der Apoptose. Unter den TAL1-Zielgenen prominent anti-apoptotisch sind BCL3, BCL2A1, BMF, MYC und HEMGN aber auch für UBE2F und SOST ist der Effekt beschrieben.

Aus der **BCL3** (+3,1-fach)-Überexpression resultiert über die Interaktion mit Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2) die Unterdrückung der p53-Aktivierung sowie der p53-induzierten Apoptose²⁴². Entsprechend des beobachteten TAL1-Beitrags zum Ruhestatus von HSC¹¹³ geht die BCL3-Hochregulation potentiell mit einem Verlust der Kontrolle der Genomintegrität durch Verhinderung der Apoptose einher, dabei ist p53 an der Sicherstellung der DNA-Integrität in ruhenden HSC beteiligt³⁵⁸.

Anti-apoptotisch agiert auch **BCL2A1** (+3,2-fach). BCL2A1 ist vor allem in hämatopoetischen Zellen anzutreffen, wo es u.a. von GM-CSF oder NfκB induziert wird und nachfolgend die Apoptose inhibiert^{283,360}. Ein Beispiel ist seine Expression in der TCR-Zellselektion während der prä-T-Zelldifferenzierung mit nachfolgender Hemmung von Caspase-3; in dieser pTα-Phase korreliert die BCL2A1-Expression mit der von HOX11 und TAL1²⁸². HOX11 (TLX1) zeigt sich im vorliegenden Datensatz ohne signifikante Expressionsveränderung (p-Wert 0,6, q-Wert 1, Fold Change 1-fach), zudem reprimiert TAL1 mit dem Ergebnis der RNAseq in K562-Zellen BCL2A1. Möglicherweise ist die in der o.g. Literatur beobachtete zeitgleiche Expression von HOX11 und TAL1 für eine BCL2A1-Hochregulation notwendig. Eher jedoch reprimiert TAL1 BCL2A1 im Rahmen der berichteten Rolle bei der Aufrechterhaltung des ruhenden HSC-Pools¹¹³.

Ebenfalls apoptose-relevant ist **BMF** (+5,6-fach). BMF wird durch p53 reguliert^{285,286}. Infolge von Zellschädigung, Verlust von Zell-Zellkontakten oder Interferon-Gamma inhibiert BMF anti-apoptotische B-Cell Lymphoma 2 (BCL2)-Proteine²⁸⁷; deren Verlust ist im Mausmodell mit der Entwicklung von hämatopoetischen Neoplasien

verbunden^{359,360}. Eine TAL1-Regulation von BMF wurde bislang nicht beschrieben; die Einflussnahme passt jedoch zur oben bei BCL2A1 beschriebenen TAL1-Funktion bei ruhenden HSC.

MYC (-2,1-fach) wurde bereits unter 6.2.1. vorgestellt; in Ergänzung zur Rolle bei Proliferation und Anti-Differenzierung ist auch die Apoptose MYC-beeinflusst; in K562-Zellen wird sie durch MYC-Herunterregulation induziert³¹⁰. Dies steht im Kontrast zum o.g. Beitrag der BCL-Proteine, so dass letztlich die Integration der unterschiedlichen pro- und anti-apoptotischen Signale für das Zellschicksal entscheidend sein dürfte.

Ebenso wurde **HEMGN** (-3,6-fach) bereits unter 6.2.1 als neues TAL1-Zielgen in K562-Zellen vorgestellt. HEMGN hat neben dem proliferationsfördernden passend auch einen anti-apoptotischen Effekt: die Überexpression in CD34+ Zellen verhindert deren Apoptose¹⁵⁵, was auch über die Aktivierung von NFκB zu erklären ist¹⁵³.

Einfluss auf die Apoptose hat auch der vor allem in Embryonalentwicklung und Onkogenese wichtige Wnt-Signalweg. Zu dessen negativen Regulatoren gehört auch das neu identifizierte TAL1-Zielgen **SOST** (+6,3-fach), in Tumorzellen folgt aus dem SOST-Knockdown die Verhinderung der Apoptose²³⁴.

Wie oben unter 6.2.2. dargestellt folgt bei reduzierter **UBE2F**-Expression (nach TAL1-Knockdown: -2,2-fach) in Lungen-Ca-Zellen infolge verminderter Neddylierung ebenfalls die Apoptose²⁰².

6.2.4. Zielgene mit Beitrag zur Zell-Immortalisierung?

Für das Wachstum von Krebszellen ist auch die Immortalisierung der Ausgangszellen notwendig, d.h. vor allem die Fähigkeit zur Erhaltung der Telomerlänge. Zusätzlich trägt wahrscheinlich auch die Entwicklung von numerischen Chromosomenanomalien (Aneuploidie) zur Immortalisierung bei³¹¹.

Die humane Telomerase (hTERT) wird durch den TAL1-Knockdown 3-fach herunterreguliert, ist jedoch entsprechend der ChIPseq in K562-Zellen kein TAL1-Zielgen. Da TAL1 nach den Ergebnissen der RNAseq MYC reguliert – und MYC als Aktivator des hTERT-Promotors beschrieben ist³⁶¹ – könnte die hTERT-Expressionsveränderung MYC-vermittelt zu erklären sein.

K562-Zellen weisen mit einer modalen Chromosomenzahl von 67 neben der Translokation BCR-ABL auch eine Aneuploidie auf, die zur Genominstabilität beitragen

könnte. Hieran könnten neu identifizierte TAL1-Zielgene beteiligt sein, so resultiert wie oben beschrieben aus der BCL3 (+3,1-fach)-Überexpression eine MDM2-vermittelte Unterdrückung der p53-Aktivierung und damit die Verhinderung der Reaktion auf DNA-Schäden. Eine Einbindung in das p53-Netzwerk gilt auch für NR4A2 (+4,5-fach), YPEL3 (+2,6-fach) und BMF (+5,6-fach) (s.o.).

6.2.5. Zielgene mit Beitrag zur Neo-Angiogenese?

Die Neo-Angiogenese im Knochenmark hat als Element der vaskulären Nische Relevanz bei Leukämien³⁶²⁻³⁶⁴; auch hier zeigen sich TAL1-Zielgene: EGFL7, LTBP3, ADAM8, PTGS1 und IL23A.

Der **EGFL7** (-4,6-fach)-Knockdown im Zebrafisch verhindert die Bildung von Blutgefäßen¹⁸³. Im Mausmodell ist der EGFL7-Knockout phänotypisch unauffällig, wird jedoch die im EGFL7- Intron 7 beheimatete mir126 ausgeknockt, so stellen sich schwere Schäden der Angiogenese dar¹⁸⁴; vergleichbares ist beim konditionalen TAL1-Knockout mit schweren Defekten des embryonalen Gefäßsystems zu beobachten¹⁰⁹. Bei Tumoren korreliert die erhöhte Expression von EGFL7 mit der Anzahl von Mikrogefäßen und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert¹⁸⁵ – in Relation hierzu zeigt sich eine TAL1-Expression im Rahmen der Tumor-assoziierten Neo-Angiogenese⁷⁵. EGFL7 (ggf. Mitregulation von mir126) als neues TAL1-Zielgen korreliert mit dem bisherigen Erkenntnisstand zu TAL1s Funktion bei der Angiogenese. So zeigten sich im konditionalen TAL1-Knockout zur Letalität führende Defekte in der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems, die insbesondere die angiogenetische Modifikation des Kapillarnetzes betrafen¹⁰⁹.

LTBP3 (+2,6-fach) ist entscheidend an der Neo-Angiogenese von malignen Tumoren beteiligt, der Knockdown führt zu einer gestörten Gefäß-Mikroarchitektur und verhindert die frühe Intravasation von Krebszellen²⁷¹. Diese Beobachtung geht auch mit dem bestehenden Wissen über schwere Defekte der embryonalen Gefäßbildung im Zuge des TAL1-Knockouts¹⁰⁹.

In dieses Bild passt auch **ADAM8** (+2,9-fach). ADAM8 ist im Mausmodell bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen während der Neo-Angiogenese nach Wirbelsäulenverletzungen beteiligt³¹². Die Überexpression resultiert in einem verstärkten Ectodomain-Shedding von Membranproteinen mit Beteiligung an der Neo-Angiogenese;

der Knockout führt im Mausmodell zu vermindertem Tumorwachstum, so dass eine Rolle von ADAM8 als negativer Regulator der Angiogenese postuliert wird³¹³. Im Graftmodell zeigen Brustkrebszellen mit ADAM8-Knockdown eine schlechte Vaskularisierung und grössenbedingten Wachstumsstopp³¹⁴.

Eine pro-angiogenetische Wirkung hat auch das **PTGS1**-Produkt Thromboxan A₂³¹⁵.

IL23A bildet zusammen mit IL23B das Cytokin IL23. IL23 ist im Mausmodell mit Neo-Angiogenese und der vermehrten Expression der ebenfalls pro-angiogenen Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) verbunden²³².

6.2.6. Zielgene mit Beitrag zur Gewebeinvasion und Metastasierung?

Leukämiezellen haben als entartete Leukozyten inhärent metastatische Eigenschaften. Angesichts der veränderten Expression von TAL1 auch bei verschiedenen soliden Tumoren erfolgte jedoch eine Analyse der Zielgene auch unter dem Gesichtspunkt der Gewebeinvasion und Metastasierung. Für diesen Prozess konnten POU3F2, VBP1, FUCA1, LTBP3, PBXIP1, FRK, SOST, ADAM8, ITGB7, NR4A2, PTGS1, PLA2G16 und RARRES3 identifiziert werden.

Eine erhöhte **POU3F2**-Expression (nach TAL1-Knockdown -3,1-fach-verändert)- ist beim Melanom mit verstärkter Metastasierung assoziiert¹⁹⁴; im Xenograft-Modell führt der Knockout zur verminderten Metastasierung³¹⁶.

VBP1 (-2,9-fach) wird ebenfalls durch TAL1 positiv reguliert, agiert jedoch im Gegensatz zu POU3F2 anti-metastatisch: VBP1 bindet an den pVHL-Tumorsuppressor, und bewirkt so die Ubiquitinierung und den Abbau von Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α). In vivo konnte gezeigt werden, dass VBP1 eine Tumormetastasierung verhindert, dagegen führt der Knockdown zur drastischen Zunahme¹⁹⁹.

Alle anderen vorgenannten Gene werden durch TAL1 in K562-Zellen reprimiert und erst nach Knockdown hochreguliert, so bei **FUCA1** (+2,8-fach). FUCA1 ist in aggressiven und Metastasen-streuenden Tumoren herunterreguliert³¹⁷; es zählt zu den p53-induzierten Genen²⁶⁶.

LTBP3 (+2,6-fach) ist im Rahmen der Metastasierung am Gefässeintritt von Tumorzellen beteiligt²⁷¹ und bislang ebenfalls nicht als TAL1-Zielgen beschrieben.

Gleiches gilt für **PBXIP1** (+3,3-fach). PBXIP1 wird bei zahlreichen Tumorentitäten verstärkt exprimiert und geht mit vermehrter Migration, Invasion und Metastasierung einher²⁶²⁻²⁶⁵.

Dagegen verhindert eine **FRK** (+2,2-fach)-Überexpression die Proliferation und Invasion von Brustkrebszellen in vitro und in vivo, wohingegen der Knockdown normale Brustepithelien transformiert²⁶⁸.

Aus dem Knockdown des negativen-Wnt-Regulators **SOST** (+6,3-fach) resultiert in Retinoblastoma-Zellen neben der vermehrten Proliferation und Inhibition der Apoptose (vgl. oben) auch eine verstärkte Invasion²³⁴.

Demgegenüber stehen jedoch wieder die berichteten Effekte der Überexpression der Metalloproteinase **ADAM8** (+2,9-fach). Diese ist mit Tumorzell-Migration und -Invasion verbunden^{248,249}. Aus dem Knockdown resultieren beim Brustkrebs weniger zirkulierende Tumorzellen und weniger Gehirnmetastasen³¹⁴.

Auch **ITGB7** (+4,1-fach) wird nach TAL1-Knockdown vermehrt exprimiert; ITGB7 ist beim Multiplen Myelom an der Zellmigration, -adhäsion und -invasion beteiligt²²².

Ebenso ist eine Beteiligung von **NR4A2** (+4,5-fach) an der Zellproliferation, Transformation, Invasion und Migration sowie Chemoresistenz von Plattenepithelkarzinomen beschrieben²⁰⁴⁻²⁰⁸.

Als pro-metastatisch ist auch das COX1-Produkt Thromboxan A2 bekannt³¹⁵, für die **PTGS1** (+2,3-fach) codiert.

Auch die Phospholipase **PLA2G16** (+2,8-fach) wird erst nach TAL1-Knockdown hochreguliert; sie wird bei Osteosarkomen sowie bei spezifischen Brustkrebs-Entitäten von p53-Mutanten induziert und ist mit verstärkter Aggressivität und Metastasierung verbunden^{297,298}.

Dagegen ist eine verstärkte Expression von **RARRES3** (+2,8-fach) beim Brustkrebs aufgrund verstärkter Adhäsion mit verstärkter Metastasierung verbunden¹⁸⁹.

Aufgrund der Leukozyten inhärent gegebenen metastatischen Eigenschaften kann zu den o.g. TAL1-Zielgenen hinsichtlich der Effekte bei den zumeist in soliden Tumoren beobachteten Genexpressionen keine wirkliche Aussage zur dortigen Wirkung von TAL1 getroffen werden; betrachtet man K562-Zellen so ergibt sich ein gemischtes Bild: bei fünf Zielgenen agiert TAL1 hier pro-metastatisch (POU3F2, FUCA1, FRK, SOST und

PTGS1), bei acht hat der TF einzeln betrachtet anti-metastatische Effekte (VBP1, LTBP3, PBXIP1, ADAM8, ITGB7, NR4A2, PLA2G16 und RARRES3).

6.2.7. Zielgene mit Beitrag zum Energiestoffwechsel?

Aerobe und anerobe Atmung sind unverzichtbar für Zellteilung und Kanzerogenese; letztere zeichnet sich auch durch einen Überhang der Glykolyse mit Laktämie aus^{365, 366}. Als neue TAL1-Zielgene mit Relevanz im Energiestoffwechsel zeigten sich SLC16A9, PKLR und NT5M:

Zu den Monocarbonsäuren zählen Laktat und Pyruvat. **SLC16A9** (-2,4-fach) ist ein Monocarbonsäure-Transporter, der für den Fettsäurestoffwechsel entscheidende Carnitine transportiert. Fettsäuren werden gebunden an Carnitin zur oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien transloziert¹⁷⁷. SLC16A9 wird verstärkt bei diffus-grosszelligen ZNS-Lymphomen³¹⁸ sowie bei einigen therapieresistenten Tumoren exprimiert¹⁷⁹.

Ebenso wie zu SLC16A9 fehlen zu **PKLR** (-3,1-fach) bislang Erkenntnisse zur Verbindung zum TAL1-Netzwerk. PKLR1 ist eine leber- und erythrozytenspezifische Isoform der Pyruvatkinase, die als letzten, geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Glykolyse die Transphospholyierung von Phosphoenolpyruvat zu Adenosindiphosphat katalysiert. Als Produkt folgt hieraus ATP und Pyruvat. Die Identifizierung von PKLR als neues TAL1-Zielgen in K562-Zellen korreliert mit den bestehenden Erkenntnissen zur Rolle des TF in der Erythropoese.

Potentiell bei der onkogenen Transformation beteiligt ist **NT5M** (-2,1-fach). NT5M codiert für eine Nukleotidase, die an der mitochondrialen Matrix den Pool zur Synthese mitochondrialer DNA benötigter Pyrimidineoxyribonucleotide (dTTP, dCTP) negativ kontrolliert, wodurch die Replikation mitochondrialer DNA (mtDNA) reguliert wird, da im Überschuss vorhandenes dTTP zur unkontrollierten Synthese von mtDNA führt³¹⁹. Die mtDNA-Kopienzahl wird in der Entwicklung strikt kontrolliert³¹⁹, Imbalancen sind mit der onkogenen Transformation verbunden^{320,321}. Eine TAL1-Beteiligung an der Kontrolle der mtDNA-Kopienzahl via NT5M war bislang nicht bekannt.

6.2.8. Zielgene mit Beitrag zur Immunevasion?

Eine weitere Eigenschaft von Krebszellen ist die Immunevasion. Hierzu wichtige Zielgene wurden mit CMTM6, PTGS1 und IL23A identifiziert.

CMTM6 (+,2,2-fach) reguliert über eine reduzierte Ubiquitinierung und Verlängerung der Halbwertszeit die Membranexpression und das lysosomale Recycling von PD-L1^{272,322}. Die PD-L1-Expression führt über die Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor PD-1 zur T-Zell-Anergie und somit zur Selbst-, aber auch Tumortoleranz^{323–326}. Infolge des TAL1-Knockdowns kommt es folglich in K562-Zellen bei gesteigerter CMTM6-Expression – zumindest auf RNA-Ebene – zum Status einer vermehrten Tumortoleranz.

Auch das Prostaglandin E2 (PGE2) kann an der Immunevasion von Krebszellen beteiligt sein²⁹⁰. **PTGS1** (+2,3-fach) codiert für COX1, die aus Arachidonsäure Prostaglandin H2 katalysiert, das wiederum das Substrat für die Produktion von PGE2 ist. Entsprechend präklinischer Daten wirken COX-Inhibitoren wie Aspirin synergistisch mit PD-1-Inhibitoren bei der Wiederherstellung der Immunantwort im Brustkrebs, Colon-Ca und Melanom-Modell²⁹⁰.

Eine weitere immunevasive Komponente ist über **IL23A** (+2,1-fach) möglich, das zusammen mit der zweiten Untereinheit IL23B das Cytokin IL23 bildet; dieses kann bei Tumorerkrankungen eine verminderte Infiltration durch zytotoxische CD8+ T-Zellen bewirken²³². Somit scheint der TAL1-Knockdown die Immunevasion zu fördern.

6.2.9. Zielgene mit Beitrag zu Tumormikroumgebung und Entzündung?

Die Tumormikroumgebung ist entscheidend am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt; in ihr kontrollieren Tumorzellen vor allem nicht entartete Immunzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten und schaffen so ein der Proliferation und Immunevasion förderliches Umfeld^{367,368}. Als neue TAL1-Zielgene stellten sich hier PTGS1, PLA2G16 und IL23A dar:

Das via **PTGS1** (+2,3-fach) synthetisierte Prostaglandin H2 und die daraus katalysierten PGE2/PGF2, Prostacycline und Thromboxane sind auch Faktoren einer chronischen Entzündung, die wiederum eine relevante Ursache in der Herausbildung von malignen Neoplasien ist^{290,327–329}. Neben PTGS1 folgt nach TAL1-Knockdown in K562-Zellen auch bei PTGS2 (COX2, +3,6-fach) und PTGES (PGE2-Synthase, +3,7-fach) eine

signifikante Expressionsveränderung, ohne jedoch eine TAL1-Bindung im Promotorbereich zu zeigen. Erhöhte Prostaglandin-Spiegel können im Tumormikromilieu NK- und T-Zellen inaktivieren, die immunsuppressive Wirkung von tumorassoziierten Makrophagen steigern und über Induktion von u.a. VEGF die Angiogenese sowie den stammzell-ähnlichen Status von Krebszellen fördern^{327,330-336}.

Einen weiteren potentiellen Beitrag hierzu leistet **PLA2G16** (+2,8-fach). PLA2G16 codiert für HRASLS3, der geschwindigkeits-regulierender Faktor in der PGE2-Synthese aus Arachidonsäure ist²⁹⁵.

In Ergänzung zur o.g. (vgl. 6.2.8.) Rolle von **IL23A** (+2,1-fach) bei der Immunevasion wird bei Tumorerkrankungen eine IL23-vermittelte verstärkte Inflammation, Angiogenese und verminderte Infiltration durch zytotoxische CD8+ T-Zellen berichtet²³²; beim Colon-Ca wird IL23 aus der Tumormikroumgebung durch Tumorassoziierte myeloide Zellen sezerniert²³³.

Ein TAL1-Beitrag zur Regulation der Tumormikroumgebung ist aktuell noch nicht bekannt; angesichts der nach Knockdown hochregulierten pro-entzündlichen Zielgene könnte der TF hier möglicherweise anti-inflammatorisch wirken.

6.2.10. Zielgene mit Beitrag zur Therapieresistenz?

Eine Erweiterung der Hanahan'schen Prinzipien ist die Einbeziehung der für ein Therapieansprechen relevanten Gene. Im vorliegenden Datensatz zeigen sich hierzu als TAL1-Zielgene: AHI1, ADAM8, IL1RL1, ATG16L2, SLC16A9, NR4A2, BCL2A1 und MYC.

AHI1 (+2,2-fach nach TAL1-Knockdown) wird von TAL1 in K562-Zellen reprimiert; es interagiert mit BCR-ABL und hebt die Wirkung der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Imatinib, Dasatinib und Nilotinib zusammen mit IL3 komplett auf¹⁶².

Ebenfalls erst nach TAL1-Knockdown hochreguliert stellt sich **ADAM8** (+2,9-fach) dar. TKI-resistente CML-Stammzellen zeichnen sich durch ADAM8-Expression aus; die ADAM8-Hemmung führt hier in vitro zur erneuten TKI-Sensitivität²⁵⁰.

Eine pathologische Expression des für sST2 und ST2 codierenden Gens **IL1RL1** (+4,87-fach) ist bei der CML in CD34+ Progenitoren zu beobachten: hier verhindert IL-33 über die Bindung an ST2 die Imatinib-Wirkung²¹².

In einer weiteren Studie korrelierte die Hypermethylierung im **ATG16L2** (+2,2-fach)-Promotorbereich bei 69% der CML-Patienten mit einem signifikant reduzierten Ansprechen auf Imatinib²⁵⁴.

Auch **NR4A2** (+4,5-fach) wird erst nach TAL1-Knockdown hochreguliert. NR4A2 ist mit der 5-Fluorouracil und Doxorubicin-Resistenz bei Plattenepithel-Ca korreliert²⁰⁶. Ebenfalls ist eine verstärkte Therapieresistenz bei **BCL2A1**-Überexpression (+3,2-fach nach TAL1-Knockdown) zu beobachten, so gegen Etoposid und Cisplatin²⁸³.

SLC16A9 (-2,4-fach) wird von TAL1 hochreguliert. SLC16A9 zeigt sich in PI3K/mTOR-Inhibitor-resistenten Karzinomzellen deutlich überexprimiert¹⁷⁹ und ist an einem Gennetzwerk der Adriamycin-Resistenz beteiligt¹⁸⁰.

Zudem treibt TAL1 die **MYC**-Expression (nach TAL1-Knockdown -2,1-fach verändert). MYC wird in therapieresistenten Leukämiezellen stark exprimiert, erhöht deren Proliferation und verhindert ihre Differenzierung; diese Effekte werden durch eine MYC-Inhibition aufgehoben¹⁶⁵.

Insgesamt zeigt sich eine TAL1-Expression im betrachteten Datensatz folglich als eher mit Therapieansprechen auf die o.g. Therapeutika assoziiert, so mit dem auf TKI. Allerdings steht diesen Effekten die positive Regulation von MYC durch TAL1 gegenüber.

6.2.11. lncRNA und Hanahan'sche Prinzipien?

Die entsprechend der NONCODE-Datenbank annotierten lncRNA-Treffer sind weit überwiegend bislang funktionell nicht untersucht, so dass zu ihrer Relevanz noch keine Aussagen möglich sind. Exemplarisch für die 416 signifikant veränderten lncRNA mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich sind anhand der Lagebeziehung vor allem GO-Terme für die Regulierung von Zellwachstum und Entzündung.

NONHSAG004695 (+15,7-fach) wird anti-sense zur bei zahlreichen Tumorerkrankungen epigenetisch hypermethylierten lincRNA RP11-443B7.3-001 codiert, die in einer Netzwerkanalyse besonders mit p53 und EGFR assoziiert wird²⁹⁹.

Für die im **NONHSAG003220** (+9,0-fach)-Locus enthaltene lncRNA RP11-404F10.2 wird eine Herunterregulation beim Multiplen Myelom beschrieben³⁰². NONHSAG003220 liegt anti-sense und damit potentiell aktiv zu CD48, das bei der AML durch AML-ETO unter Beteiligung von HDAC1 herunterreguliert wird; infolgedessen

können NK-Zellen die Tumorzellen nicht mehr erkennen³⁰⁰. Weiterhin ist CD48 bei der Interferon-Gamma-Produktion sowie der Regulation von long-term quiescent HSC beteiligt³⁰¹.

NONHSG001514 (lincRNA RP11-117D22.2, +4,7-fach) zeigt sich eine Hochregulierung in t(12;21)-positiven pre-B ALL-Zellen mit der Translokation ETV6/RUNX1³⁰⁵.

NONHSAG050736 (-5,0-fach) wird innerhalb des Runt-related transcription factor 1; translocated to 1 (RUNX1T1, auch bekannt als ETO)-Locus codiert und nach TAL1-Knockdown 5-fach herunterreguliert. ETO wurde über die Translokation t(8;21) entdeckt und agiert als Copressor der HSC-Differenzierung durch v.a. der Rekrutierung von HDAC.³³⁷

NONHSAG001368 (-7,8-fach) wird im TAL1-Locus codiert, korreliert zu einem prozessierten Transkript in der ENSEMBL-Annotation und ist vor allem in Exosomen gesunder Probanden vorhanden (NONCODE-Daten, vgl. 5.3.2.7.).

6.3. Zielgene mit Relevanz in der Erythropoese?

Neben Beiträgen zur Onkogenese ermöglicht die der Bezug der K562-Zellen zur Erythroleukämie auch Aussagen zu möglichen TAL1-Zielgenen in der Erythropoese. Als relevant konnten HEMGN, PKLR, Mitglieder des HbA-Locus, GFI1B, ERMAP, HMBS, SLC2A1 und PBXIP1 identifiziert werden.

TAL1 reguliert nach den Ergebnissen von RNA- und ChIPseq **HEMGN** (nach Knockdown -3,6-fach verändert). HEMGN wird nach EPO-Behandlung von CD34+ Zellen hochreguliert; die Überexpression in CD34+ Zellen führt zur erythroiden Differenzierung¹⁵³.

Ebenfalls während der Erythropoese wird **PKLR** (-3,1-fach) hochreguliert. PKLR codiert für eine leber- und erythrozytenspezifische Isoform der Pyruvatkinase, die als letzten Schritt der Glykolyse die Transphospholyierung von Phosphoenolpyruvat zu Adenosindiphosphat katalysiert. Als Produkt folgt hieraus ATP und Pyruvat. Während der Erythropoese kommt es zu einem Isoformenwechsel von der proliferationsassoziierten Pyruvatkinase M2 (PKM2) zu PKLR¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Auch bei der Regulation von drei **HbA**-Molekülen (HBA1 -3,5-fach, HBA2 -2,9-fach, HBG1 -2,7-fach)-Globin-LCR spielt TAL1 eine Rolle¹²¹⁻¹²⁸.

Dies bestätigt sich über **GFI1B** (-2,2-fach). GFI1B ist essentiell für die murine Erythro- und Megakaryopoese: GFI1B $-/-$ verstarben während des Übergangs von der primitiven zur definitiven Hämatopoese mit Entwicklungsstillstand der Vorläuferzellen¹⁶⁷. Im konditionellen Knockout wurde gezeigt, dass GFI1B an der Regulation der Globinexpression sowie Erythrozytenreifung beteiligt ist³³⁸.

Die Expression von **ERMAP** (-2,1-fach) nimmt ebenfalls im Rahmen der erythroiden Differenzierung zu, was anhand des Antimetaboliten Cytarabin in K562-Zellen gezeigt wurde²⁰¹.

Gleiches gilt für die Hydroxymethylbilane synthase (**HMBS**, -2,2-fach), die einen Schritt der Hämsynthese katalysiert; durch sie werden vier Moleküle Porphobilinogen zu Hydroxymethylbilan verbunden.

Auch **SLC2A1** (-2,1-fach) ist an der erythroiden Differenzierung beteiligt, die Expression nimmt im Rahmen der Differenzierung drastisch zu³³⁹.

Aus der **PBXIP1** (+3,3-fach)-Überexpression folgt in CD34+ Zellen die vermehrte Bildung von hematopoetischen koloniebildenden Einheiten²⁶¹.

6.4. Zielgene mit Beitrag zur Osteogenese?

Für TAL1 ist aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auch eine Beteiligung bei der Osteogenese bekannt⁷⁶. Im Rahmen des Experiments konnten als weitere potentielle TAL1-Zielgene der Osteogenese (sofern aus K562-Zellen übertragbar) TMEM64, ADAM8 und SOST identifiziert werden:

TMEM64 (-2,1-fach) beeinflusst über die Regulation des Wnt-Signalwegs (CTNNB1) die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen statt zur Adipogenese zur Osteogenese; die Überexpression von TMEM64 inhibiert die Osteo- und fördert die Adipogenese über die Verringerung von β -Catenin²³⁶.

Lösliches **ADAM8** (+2,9-fach) induziert im Mausmodell die Osteoklastogenese und fördert deren Differenzierung²⁴⁷.

SOST (+6,3-fach) codiert für Sclerostin, das knochenspezifisch exprimiert wird und als negativer Regulator des Wnt-Signalwegs das Knochenwachstum inhibiert³⁴²⁻³⁴⁴.

6.5. Knockdown induzierte Genexpressionsveränderungen

Neben der Identifizierung von neuen TAL1-Zielgenen gelangen über die Arbeit auch neue Erkenntnisse über TAL1-induzierte Genexpressionsveränderungen in K562-Zellen, die mangels Nachweis einer relevanten TAL1-Bindung im Bereich der TSS auf nicht-DNA-abhängiger Interaktion des TF mit weiteren GRN-Mitgliedern beruhen müssen.

6.5.1. Herrunterregulierte Gene

In Korrelation zur bestehenden Literatur und TF-Funktion, die TAL1 als wichtigen Leukämie- (vgl. Abschnitt 3.1.) und Stammzellefaktor sieht (vgl. Abschnitt 3.4.) zeigte die GO-Analyse nach Knockdown eine signifikante Herunterregulation von Genen, die mit Leukämie, Stammzellstatus und TF-Aktivität assoziiert werden (Abbildung 17). Hinsichtlich der biologischen Funktion ist die Beteiligung an der Erythropoese bekannt (vgl. 3.6.) und zeigt sich mit prominent an erster Stelle platziertem Sauerstoff-Transport (Abb. 18). Weitere GO-Assoziationen sind vor allem die zur Entwicklung von röhrenförmigen Geweben, Epithelien, Astrozyten und Synapsen. Die bestehenden Berichte zu TAL1s Rolle bei der Herzschauch-Bildung³⁴⁵ sowie Differenzierung von Astrozyten³⁴⁶ bestätigen die Sensitivität der durchgeführten RNAseq. In der KEGG-Analyse der herunterregulierten Gene (Abb. 21) platzieren sich Infektionskrankheiten an erster Stelle, wohingegen die Beteiligung am Wnt-bzw., Tumor-Signalwegen und AML erwartet werden konnte. Neu ist hier jedoch die Zuordnung zu Axon-Wachstum, cholinergem Synapse und Sphingolipid-Signalwegen. In der Analyse der molekularen Signatur (Abb. 22) finden sich wieder die bekannten Relationen zur Erythropoese/Sauerstofftransport, zur AML, zudem Stammzellzuordnungen und zahlreiche Gene, die durch den Aminopeptidase-Inhibitor Tosedostat nach 24h induziert werden. Klar dominierend bei den signifikant veränderten lncRNA mit TAL1-Bindung im TSS-Bereich sind anhand der Lagebeziehung GO-Terme für die Regulierung von Zellwachstum, Entzündung und u.a. Telomer-Maintenance. Allerdings sind die meisten entsprechend der NONCODE-Datenbank annotierten lncRNA-Treffer bislang funktionell nicht untersucht, womit zu ihrer Relevanz noch keine Aussagen möglich sind.

6.5.2. Hochregulierte Gene

Nach TAL1-Knockdown stellten sich umfassende Veränderungen von membranständigen Proteinen dar (Abb. 50), die in der Analyse nach betroffenen biologischen Prozessen alle der Immunantwort zuzuordnen sind (Abb. 49). Hinsichtlich der Funktion umfassen die Treffer abstrakt Cytokinbindung und Rezeptoraktivität (Abb. 51), bei denen in der Analyse nach KEGG (Abb. 52)- und molekularer Signatur (Abb. 53) - neben Zuordnung zum hämatopoetischen System - Immunantworten (NFkB-Signalweg, die NK-Zell-vermittelte Zelltoxizität und Infektionen) stehen. Betrachtet man die der Hämatopoese zugeordneten Veränderungen genauer (Abb. 58), so zeigt sich eine verstärkte Expression von Differenzierungsmarkern der myeloiden (u.a. GM-CSF, CD123), aber mit zahlreichen hochregulierten Komponenten des T-Zellrezeptors auch der lymphoiden Reihe (CD3G, CD3E, CD3D). Mit einem Fold Change von 5,5 ist eine CD3-Rezeptorunterheit des TCR, CD3G, am stärksten verändert. Dementsprechend könnte eine Expressionsveränderung von TAL1 im multipotenten gemeinsamen Progenitor (vgl. Abb. 4) über das weitere myeloide oder lymphoide Zellgeschehen entscheiden. Dies korreliert zu den bisherigen Beobachtungen der fehlenden TAL1-Expression in Lymphozyten⁷²⁻⁷³.

6.6. Limitationen und methodischen Einschränkungen

Die Korrelation der Ergebnisse der GO-Analysen sowie die Funktion der identifizierten Zielgene zeigen die Relevanz der Erkenntnisse, die jedoch limitierend aus K562-Zellen resultieren und damit eine Tumorzelllinien- bzw. Zelllinien inhärent verbundene Veränderung im Vergleich zur Situation im Organismus beinhalten. Ferner führt auch die Einführung eines lentiviralen Vektors zu Genexpressionsveränderungen, die jedoch über die gewählte Kontrolle (shLacZ) minimiert wurden. Einschränkend für die lncRNA ist die polyA-Aufreinigung im Rahmen der Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken zu nennen, somit sind zahlreiche weitere – nicht polyadenylierte – ncRNA-Zielgene zu erwarten. Die identifizierten TAL1-Zielgene in K562-Zellen bedürfen demnach system- und frageabhängig einer Überprüfung in leukämischen, erythroiden oder osteogenese-relevanten Patientenzellen.

6.7. Fazit und Ausblick

Die Kombination aus RNAseq und ChIPseq ist geeignet eine Vielzahl interessanter TF-Zielgene zu identifizieren. TAL1 nimmt demnach in K562-Zellen auf allen Ebenen der Hanahan'schen Prinzipien Einfluss auf das Zellschicksal. Komplexe Interaktion mit hoch- bzw. herunterregulierten Zielgenen und Signalkaskaden, Beteiligung am JAK/STAT und Wnt-Signalweg, an TCR-Elementen und zahlreichen Effektoren in u.a. Proliferation, Angiogenese, Apoptose und Inflammation konnten aufgedeckt werden und so der Wissenstand um potentielle pro- und anti-onkogene Wirkungen ergänzt werden. Hinsichtlich der lncRNA sind interessante expressionsveränderte Zielgene identifiziert worden, die jedoch noch funktionell charakterisiert werden müssen. Aufgedeckt wurden auch relevante TAL1-Zielgene für den Beitrag des TF zur Erythropoese und potentiell Osteogenese. Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen ist nun eine Vielzahl von weiteren Untersuchungsmöglichkeiten gegeben.

Zunächst könnte eine Auswahl von Zielgenen dieser Arbeit via erneuter ChIPseq in K562-Zellen, aber auch weiteren Tumorzell-Linien und vor allem auch Patientenzellen bestätigt werden. Hierzu könnten bei codierenden Zielgenen beispielsweise HEMGN, EGFL7 (inkl. mir126), AHI1, PKLR oder CMTM6 neben Transkriptionsfaktoren wie GFI1B oder CEBPE ausgewählt werden. Auf Ebene der lncRNA könnten zuerst stark positiv und negativ regulierte lncRNA, wie u.a. NONHSAG004695 oder NONHSAG001368 genauer untersucht werden. Hierzu könnten einzelne oder mehrere Zielgene im Effekt des Knockdowns oder Knockouts bzw. der plasmidgestützten Überexpression betrachtet werden. So könnten bei den ncRNA einzelne shRNA, aber auch ein Cocktail für mehrere lncRNA mit nachfolgender Analyse der Genexpressions- und Phänotypveränderungen getestet werden.

In einem weiteren Schritt ist zur funktionellen Charakterisierung der lncRNA ein komplettes bzw. konditionelles Ausschalten im Mausmodell im Zuge der Genomeditierung via z.B. CRISPR/Cas denkbar.

Die so gewonnenen Erkenntnisse könnten die Basis für zielgenaue Therapeutika (z.B. eines shRNA-Cocktails im hämatopoetisch adressierten Vektor), aber zuvor auch schon als Biomarker, beispielsweise der Therapieresistenz sein.

7. Zusammenfassung

Das Verständnis der molekularen Zusammenhänge des Lebens baut auf dem Erkenntnisstand der letzten Jahrtausende auf, exponentiell zunehmend seit der Erfindung von optischen und „biochemischen“ Mikroskopen, wie den Omics-Technologien, deren Anwendung anhand des Transkriptionsfaktors TAL1 auch Gegenstand dieser Arbeit war. Pathologisch gesehen ist die Gen- und Promotorstruktur von TAL1 aufgrund von Translokationen oder Deletionen in 20-30% der T-ALL verändert, zusätzlich findet sich eine gesteigerte Expression bei etwa 60% der pädiatrischen und ca. 45% der adulten T-ALL. Physiologisch handelt es sich bei TAL1 um einen in der Hämatopoese unverzichtbaren Transkriptionsfaktor: im murinen Knockout-Modell fehlen bereits in der frühen Embryonalperiode alle Blutzellen. Zudem spielt der TF u.a. auch in der adulten Erythropoese eine wichtige Rolle.

Die Identifikation von neuen TAL1-Zielgenen war dementsprechend sowohl aus klinischen Gründen, als auch zum Verständnis der hämatopoetischen Funktionen bedeutsam. Hierzu erfolgte eine Kombination aus RNA- und ChIPseq. Nach lentiviral vermitteltem TAL1-Knockdown in K562-Zellen wurde eine globale Transkriptomanalyse (RNAseq) mittels Nutzung der Illumina-Hochdurchsatzmethode durchgeführt. Insgesamt ergab die RNAseq eine Milliarde Sequenzierungsfragmente („Reads“) bester Qualität, die über die etablierte Tuxedo-Suite ausgewertet wurden. Zur Selektion von Genen mit TAL1-Bindung im Promotorbereich wurden bestehende ENCODE-ChIPseq-Daten aus K562 genutzt und daraus resultierende Treffer bioinformatisch auf signifikant vertretene Terme untersucht, sowie nach herab- bzw. hochregulierten Genen und den assoziierten GO-Termen entsprechend der biologischen Prozesse, zellulären Komponenten, molekularer Funktion und dominanten KEGG-Signalwegen strukturiert. Ferner wurden mehr als zweifach expressionsveränderte lncRNA über ENSEMBL zusammen mit der TAL1-ENCODE-ChIPseq dargestellt und in Relation zu den benachbarten Genen annotiert. Es zeigten sich 3205 signifikant (p- und q-Wert $<0,05$) veränderte codierende Transkripte sowie 5136 signifikant veränderte lncRNA. Über Einbindung der ChIPseq ließ sich bei 71 codierenden und 416 lncRNA-Genen mit mindestens zweifacher Expressionsveränderung eine TAL1-Bindung im Bereich der TSS-Region nachweisen.

Mit den Ergebnissen nimmt TAL1 in K562-Zellen auf allen Ebenen der Kanzerogenese - sowohl pro- als auch antikanzerogen - auf das Zellschicksal Einfluss. Komplexe

Interaktion mit zahlreichen Zielgenen und Signalkaskaden in u.a. Proliferation (u.a. HEMGN, MYC, AHI1, YPEL3, BTG2) Angiogenese, Apoptose (u.a. BCL3, BCL2A1, BMF), Immunevasion (u.a. CMTM6) und Inflammation (u.a. IL23 und PTGS1) konnten aufgedeckt werden und so der Wissenstand um u.a. pro- und anti-onkogene Effekte des TF TAL1 relevant ergänzt werden. Zusätzlich gelang die Identifizierung von für die Erythropoese – und möglicherweise Osteogenese – relevanten Zielgenen. Auch hinsichtlich der lncRNA sind interessante potentielle Effektoren identifiziert worden, die jedoch noch funktionell charakterisiert werden müssen.

Setzt man die Ergebnisse der Arbeit in Bezug zur initial genannten Beobachtung Virchows, so konnte eine Beteiligung TAL1s am weißen Blut, dem leukämischen Geschehen, aber auch der Erythropoese bestätigt und erweitert werden: "*...Wenn ich daher von weißem Blute spreche, so meine ich in der That ein Blut, in welchem die Proportion zwischen den rothen und farblosen (in Masse weissen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist...*" (Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 1845;36:151-156).

8. Abstract

Our understanding of human biology and disease is based on the last millennia's gain of knowledge, which has been exponentially accelerated since the invention of optical and "biochemical" microscopes like transcriptomics and other omics technologies.

In order to broaden our knowledge of an important human transcription factor, T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1 (TAL1), some of these technologies were used.

TAL1's gene or promoter structure is altered in about 20-30% of T-ALL. In addition, there is an increase in TAL1 expression in ca. 60% of pediatric and about 45% of adult T-ALL. Physiologically, TAL1 is an indispensable factor in hematopoiesis: in the murine knockout model, blood cells vanish in the early embryonic period. In addition, the TF is also relevant in adult erythropoiesis.

Accordingly, the identification of novel TAL1 target genes was significant both for clinical reasons and in order to understand the hematopoietic functions.

We performed a combined RNA- and ChIPseq approach. After a lentiviral mediated knockdown in K562 cells RNAseq was performed using the Illumina high-throughput method. Overall, the RNAseq yielded one billion good quality sequencing fragments. They made identification of up- and downregulated transcripts as well as associated biological processes, cellular components, molecular function and dominant KEGG signaling pathways possible. Furthermore, more than 2-fold altered coding transcripts and lncRNA were analyzed for relevant TAL1-binding in the transcription start area. There were 3205 significantly altered coding transcripts and 5136 significantly altered lncRNA. By integrating an Encode TAL1-ChIPseq in K562 cells (using a cutoff fold change of 2x) a relevant TAL1 binding could be detected with 71 coding and 416 lncRNA genes.

The combination of RNA- and ChIPseq yields a wealth of relevant results. Accordingly, TAL1 has complex pro- and anti-malignant effects in all areas of oncogenesis like described by Hanahan and Weinberg. Various interactions with target genes and signaling cascades in inter alia proliferation (e.g. HEMGN, MYC, AHI1, YPEL3, BTG2), angiogenesis (e.g. EGFL7, LTBP3), apoptosis (e.g. BCL3, BCL2A1, BMF), immune evasion (e.g. CMTM6) and inflammation (e.g. IL23 and PTGS1) have been revealed, thus complementing the knowledge about pro- and anti-oncogenic effects of TAL1. In addition, it was possible to identify target genes relevant for erythropoiesis and possible osteogenesis. Concerning lncRNA, interesting potential effectors have been identified.

However, they still need to be functionally characterized. Relating the results to Virchow's first description of leukemia as "*white blood*" the role of TAL1 in leukemia's genesis but also in erythropoiesis has been confirmed and extended, thus contributing to explain Virchow's observation: "...*therefore, when I speak of white blood, I mean in fact a blood in which the proportion between the red and colorless (in white) blood corpuscles is reversed ...*" (Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 1845;36:151-156).

9. Literaturverzeichnis

1. Halperin EC: Paleo-oncology: the role of ancient remains in the study of cancer. *Perspect Biol Med* 2004;47:1–14.
2. Cabanne F, Gérard-Marchant R, Destaing F. *Illustrierte Geschichte der Medizin*, Bd. 5. Andreas Verlag, 1986, S. 2757ff.
3. Weinberg R. *The Biology of Cancer*, Garland Science, New York, 2013, S. 131ff.
4. Domazet-Lošo T, Tautz D. Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa. *BMC Biology* 2010;8:66.
5. Hooke R. *Micrographia, Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses*. Martyn and Allestry, London, 1665.
6. Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 1845;36:151-156.
7. Hansemann D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Archiv*. 1890;119(2):299-326.
8. Boveri T. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Fischer, Jena, 1914.
9. Friedewald WF. The initiating and promoting elements in tumor production: an analysis of the effects of tar, benzpyrene, and methylcholanthrene on rabbit skin. *Journal of Experimental Medicine* 1944;80(2):101-126.
10. Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 Nov;1:157–162.
11. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG*. 1993;9(4):138-141.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
14. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-644.
15. Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(4):500-506.
16. Bockamp EO, McLaughlin F, Murrell A, Green AR. Transcription factors and the regulation of haemopoiesis: lessons from GATA and SCL proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1994;16(7):481-488.
17. Ramsköld D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R. An Abundance of Ubiquitously Expressed Genes Revealed by Tissue Transcriptome Sequence Data. *PLoS Computational Biology*. 2009;5(12):e1000598.
18. Song L, Zhang Z, Grassegger LL, et al. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Research*. 2011;21(10):1757-1767.

19. Consortium EP. A User's Guide to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). *PLoS Biology* 2011; e1001046.
20. Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*. 2001;2(11):986-991.
21. Ohno S. So much 'junk' DNA in our genome. *Brookhaven symposia in biology*. 1972;23:366-370.
22. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*. 1980;284(5757):604-607.
23. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. April 2012.
24. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.
25. Coy S, Vasiljeva L. The exosome and heterochromatin: multilevel regulation of gene silencing. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;702:105-121.
26. Rinn JL, Chang HY. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*. 2012;81(1):145-166.
27. Hughes TR. *A Handbook of Transcription Factors*. Springer, Heidelberg, 2011. S. 1ff.
28. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Genomics and Human Genetics*. 2005;7:29-59.
29. Brownlie P, Ceska TA, Lamers M, et al. The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. *Structure*. 1997;5(4):509-520.
30. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-1612.
31. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(4):252-263.
32. Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 2003;424(6945):147-151.
33. Davidson EH. Emerging properties of animal gene regulatory networks. *Nature*. 2010;468(7326):911-920.
34. Spiegelman BM, Heinrich R. Biological Control through Regulated Transcriptional Coactivators. *Cell*. 2004;119(2):157-167.
35. Ganten D, Ruckpaul K. *Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine*. Springer, Heidelberg, 2006.
36. Skinner MK, Rawls A, Wilson-Rawls J, Roalson EH. Basic helix-loop-helix

- transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. *Differentiation; research in biological diversity*. 2010;80(1):1-8.
37. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*. 1989;56(5):777-783.
 38. Anantharaman A, Lin I-J, Barrow J, et al. Role of helix-loop-helix proteins during differentiation of erythroid cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(7):1332-1343.
 39. Condorelli G, Dimmeler S. MicroRNAs: components of an integrated system controlling cardiac development, physiology, and disease pathogenesis. *Cardiovascular Research*. 2008;79(4):551-552.
 40. Zhou H, Hu H, Lai M. Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2010;102(12):645-655.
 41. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, et al. An Atlas of Combinatorial Transcriptional Regulation in Mouse and Man. *Cell*. 2010;140(5):744-752.
 42. Ben-Tabou De-Leon S, Davidson EH. Deciphering the Underlying Mechanism of Specification and Differentiation: The Sea Urchin Gene Regulatory Network. *Science's STKE* 2006(361):pe47.
 43. Tan K, TegnEr J, Ravasi T. Integrated approaches to uncovering transcription regulatory networks in mammalian cells. *Genomics*. 2008;91(3):219-231.
 44. Davidson EH, Erwin DH. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science (New York, NY)*. 2006;311(5762):796-800.
 45. Fujimoto K, Ishihara S, Kaneko K. Network evolution of body plans. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2772.
 46. Starokadomskyy PL. Protein splicing and its evolution in eukaryotes. *Biopolymers and Cell*. 2010;26.
 47. Brandt SJ. Role of the TAL1/SCL Transcription Factor in Normal and Leukemic Hematopoiesis, in: Ravid, K; Licht, JD (Eds.): *Transcription Factors*, Wiley-Liss, New York, 2001.
 48. Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annual Review of Immunology*. 1992;10:785-807.
 49. Brandt VL, Roth DB. Recent insights into the formation of RAG-induced chromosomal translocations. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;650:32-45.
 50. Begley CG, Aplan PD, Nakahara K, Kurtzberg J, Hershfield MS. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *PNAS* 1989;86(6):2031-2035.

51. Begley CG, Lipkowitz S, Göbel V, et al. Molecular characterization of NSCL, a gene encoding a helix-loop-helix protein expressed in the developing nervous system. *PNAS* 1992;89(1):38-42.
52. Aplan PD, Raimondi SC, Kirsch IR. Disruption of the SCL gene by a t(1;3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(5):1303-1310.
53. Aplan PD, Lombardi DP, Bertness VL, Kirsch IR. Disruption of the human SCL locus by 'illegitimate' V-(D)-J recombinase activity. *Science (New York, NY)*. 1990;250(4986):1426-1429.
54. Alonso CN, Gallego MS, Rossi JG, et al. RT-PCR diagnosis of recurrent rearrangements in pediatric acute lymphoblastic leukemia in Argentina. *Leukemia research* 2012 Jun;36:704–708.
55. Delabesse E, Bernard M, Landman-Parker J, et al. Simultaneous SIL-TAL1 RT-PCR detection of all tal deletions and identification of novel tal variants. *British Journal of Haematology*. 1997;99(4):901-907.
56. Chetty R, Pulford K, Jones M, et al. SCL/Tal-1 expression in T-acute lymphoblastic leukemia: an immunohistochemical and genotypic study. *Human pathology*. 1995;26(9):994-998.
57. Huang W, Kuang SQ, Huang QH, et al. RT/PCR detection of SIL-TAL-1 fusion mRNA in Chinese T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1995;81(1):76-82.
58. Brown L, Cheng JT, Chen Q, et al. Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *The EMBO Journal*. 1990;9(10):3343-3351.
59. Bash RO, Hall S, Timmons CF, et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood*. 1995;86(2):666-676.
60. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology*. 2003;40(4):274-280.
61. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*. 1995;373(6513):432-434.
62. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*. 1996;86(1):47-57.
63. Robb L, Lyons I, Li R, et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *PNAS* 1995;92(15):7075-7079.
64. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *PNAS* 2003;100(3):992-997.

65. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood*. 1994;83(5):1200-1208.
66. Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Nakano T, Orkin SH, Hayashi S-I. Sequential requirements for SCL/tal-1, GATA-2, macrophage colony-stimulating factor, and osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand in osteoclast development. *Experimental Hematology*. 2000;28(7):833-840.
67. Real PJ, Ligeró G, Ayllón V, et al. SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification From Human Embryonic Stem Cells. *Mol Ther* 2012 Jul;20:1443–1453.
68. Brunet de la Grange P, Zink E, Armstrong F, Rouyez M-C, Pflumio F. Impairment of granulo-monocytic development of human common myeloid progenitors but not of granulo-monocytic progenitors by decreasing stem cell leukemia/T-cell acute leukemia 1 expression. *STEM CELLS*. 2008;26(6):1658-1662.
69. Green AR, Salvaris E, Begley CG. Erythroid expression of the ‘helix-loop-helix’ gene, SCL. *Oncogene*. 1991;6(3):475-479.
70. Visvader J, Begley CG, Adams JM. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene*. 1991;6(2):187-194.
71. Green AR, DeLuca E, Begley CG. Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *The EMBO Journal*. 1991;10(13):4153-4158.
72. Green AR, Lints T, Visvader J, Harvey R, Begley CG. SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene*. 1992;7(4):653-660.
73. Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo P-H, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood*. 1993;81(3):647-655.
74. Dey S. Role of the TAL1/Scl transcription factor in differentiation of bone marrow monocyte-macrophage precursors. January 2010.
75. Tang T, Shi Y, Opalenik SR, et al. Expression of the TAL1/SCL transcription factor in physiological and pathological vascular processes. *The Journal of Pathology*. 2006;210(1):121-129.
76. Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Gothert JR, Lausen J. Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. October 2011.
77. Pimanda JE, Silberstein L, Dominici M, et al. Transcriptional link between blood and bone: the stem cell leukemia gene and its +19 stem cell enhancer are active in bone

- cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(7):2615-2625.
78. John E Pimanda, Berthold Göttgens. Gene regulatory networks governing haematopoietic stem cell development and identity. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(6):1201-1211.
 79. Dore LC, Crispino JD. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood*. 2011;118(2):231-239.
 80. Dan L Longo MD. Harrison's Hematology and Oncology. April 2010:1-785.
 81. Godin I, Cumano A. Hematopoietic stem cell development. January 2006.
 82. Pimanda JE, Ottersbach K, Knezevic K, et al. Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *PNAS* 2007;104(45):17692-17697.
 83. Pimanda JE, Donaldson IJ, de Bruijn MFTR, et al. The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *PNAS* 2007;104(3):840-845.
 84. Wadman IA, Osada H, Grütz GG, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *The EMBO Journal*. 1997;16(11):3145-3157.
 85. Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 1991;11(6):3037-3042.
 86. Hsu HL, Wadman I, Baer R. Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *PNAS* 1994;91(8):3181-3185.
 87. Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, et al. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *PNAS* 1994;91(18):8617-8621.
 88. Wadman I, Li J, Bash RO, et al. Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *The EMBO Journal*. 1994;13(20):4831-4839.
 89. Agulnick AD, Taira M, Breen JJ, Tanaka T, Dawid IB, Westphal H. Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature*. 1996;384(6606):270-272.
 90. Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH. Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *PNAS* 1995;92(21):9585-9589.
 91. Lécuyer E, Hoang T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Experimental Hematology*. 2004;32(1):11-24.
 92. Lécuyer E, Larivière S, Sincennes M-C, et al. Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(46):33649-33658.

93. Ephrussi A, Church G, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 1985;227(4683):134-140.
94. Kassouf MT, Chagraoui H, Vyas P, Porcher C. Differential use of SCL/TAL-1 DNA-binding domain in developmental hematopoiesis. *Blood*. 2008;112(4):1056-1067.
95. Xu Z, Meng X, Cai Y, Koury MJ, Brandt SJ. Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *The Biochemical journal*. 2006;399(2):297-304.
96. Wilson NK, Foster SD, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell stem cell*. 2010;7(4):532-544.
97. Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. Transcriptional activity of TAL1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or- 2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(7):4576.
98. Lécuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood*. 2002;100(7):2430-2440.
99. Bai X, Kim J, Yang Z, et al. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*. 2010;142(1):133-143.
100. Hu X, Li X, Valverde K, et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *PNAS*. 2009;106(25):10141-10146.
101. Wen J, Huang S, Rogers H, Dickinson LA, Kohwi-Shigematsu T, Noguchi CT. SATB1 family protein expressed during early erythroid differentiation modifies globin gene expression. *Blood*. 2005;105(8):3330-3339.
102. Huang S, Qiu Y, Stein RW, Brandt SJ. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene*. 1999;18(35):4958-4967.
103. Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z, Brandt SJ. P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *The EMBO Journal*. 2000;19(24):6792-6803.
104. Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *The EMBO Journal*. 2006;25(2):357-366.
105. Huang S, Brandt SJ. mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(6):2248-2259.
106. Meier N, Krpic S, Rodriguez P, et al. Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development* 2006;133(24):4913-4923.
107. Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis.

- Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(23):10235-10250.
108. Smith ED, Xu Y, Tomson BN, et al. More than blood, a novel gene required for mammalian postimplantation development. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(3):1168-1173.
 109. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes & Development* 1998;12(4):473-479.
 110. Mead PE, Deconinck AE, Huber TL, Orkin SH, Zon LI. Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development (Cambridge, England)*. 2001;128(12):2301-2308.
 111. Schlaeger TM, Schuh A, Flitter S, et al. Decoding hematopoietic specificity in the helix-loop-helix domain of the transcription factor SCL/Tal-1. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(17):7491-7502.
 112. Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *The EMBO Journal*. 1996;15(16):4123-4129.
 113. Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, et al. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;115(4):792-803.
 114. Brunet de la Grange P, Armstrong F, Duval V, et al. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood*. 2006;108(9):2998-3004.
 115. Correia NC, Arcangeli M-L, Pflumio F, Barata JT. Stem Cell Leukemia: how a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage. *Leukemia*. 2016;30(10):1968-1978. doi:10.1038/leu.2016.169.
 116. Palomero T, Odom DT, O'Neil J, et al. Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;108(3):986-992.
 117. Aplan PD, Chervinsky DS, Ellsworth M, Wu C, Gross KW. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *The EMBO Journal*. 1997;16(9):2408-2419.
 118. Hansson A, Manetopoulos C, Jönsson J-I, Axelson H. The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;312(4):1073-1081.
 119. Elliott SG, Foote M, Molineux G. Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Birkhäuser, Basel, 2009. S. 4.
 120. Lanza R, Atala L (Eds.). Handbook of Stem Cells, Elsevier, Amsterdam 2004. S. 121.

121. Song S-H, Hou C, Dean A. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function. *Molecular Cell*. 2007;28(5):810-822.
122. Vernimmen D. Uncovering Enhancer Functions Using the α -Globin Locus. *PLoS Genetics*. 2014;10(10):e1004668.
123. Elnitski L, Miller W, Hardison R. Conserved E boxes function as part of the enhancer in hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. Role of basic helix-loop-helix proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(1):369-378.
124. Vernimmen D, Marques-Kranc F, Sharpe JA, et al. Chromosome looping at the human alpha-globin locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS -40). *Blood*. 2009;114(19):4253-4260.
125. Martyn GE, Quinlan KGR, Crossley M. The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2017;1860(5):525-536.
126. Philipson S, Cells RHB, Molecules, Diseases and, 2017. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. *Elsevier*.
127. Hoffbrand V, Moss P. Essential Haematology. Wiley-Blackwell, Chichester, 2011. S. 89.
128. Drissen R, Palstra R-J, Gillemans N, et al. The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes & Development*. 2004;18(20):2485-2490.
129. Elwood NJ, Cook WD, Metcalf D, Begley CG. SCL, the gene implicated in human T-cell leukaemia, is oncogenic in a murine T-lymphocyte cell line. *Oncogene*. 1993;8(11):3093-3101.
130. Robb L, Rasko JE, Bath ML, Strasser A, Begley CG. scl, a gene frequently activated in human T cell leukaemia, does not induce lymphomas in transgenic mice. *Oncogene*. 1995;10(1):205-209.
131. Kelliher MA, Seldin DC, Leder P. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *The EMBO Journal*. 1996;15(19):5160.
132. Sloan SR, Shen CP, McCarrick-Walmsley R, Kadesch T. Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(12):6900-6908.
133. O'Neil J, Billa M, Oikemus S, Kelliher M. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene*. 2001;20(29):3897-3905.
134. Portis T. Epstein-Barr Virus LMP2A Interferes with Global Transcription Factor Regulation When Expressed during B-Lymphocyte Development. *Journal of Virology*. January 2003.

135. Kitamura Y, Tanigawa T, Katsumoto T, et al. Cell growth and differentiation of a novel mouse Ito (fat-storing) cell line transformed by a temperature-sensitive mutant of simian virus 40. *Hepatology* 1997;26(2):323-329.
136. Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *The Journal of emergency medicine*. 2000;18(1):109-119.
137. Terme J-M, Wencker M, Favre-Bonvin A, et al. Cross talk between expression of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivator and the oncogenic bHLH transcription factor TAL1. *Journal of Virology*. 2008;82(16):7913-7922.
138. Terme J-M, Calvignac S, Duc Dodon M, Gazzolo L, Jordan A. E box motifs as mediators of proviral latency of human retroviruses. *Retrovirology*. 2009;6:81.
139. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.
140. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
141. Demaison C, Parsley K, Brouns G, et al. High-Level Transduction and Gene Expression in Hematopoietic Repopulating Cells Using a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Lentiviral Vector Containing an Internal Spleen Focus Forming Virus Promoter. *Human gene therapy*. 2002;13(7):803-813.
142. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-334.
143. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*. 2012;7(3):562-578.
144. Brown J, Pirrung M, McCue LA. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. June 2017.
145. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 2009;4(1):44-57.
146. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. 2005;21(18):3674-3676.
147. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research* 2009 Jul;37:W305-11.
148. Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(1):27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27.
149. Flicek P, Amode MR, Barrell D, et al. Ensembl 2012. *Nucleic Acids Research* 2012

- Jan;40:D84–90.
150. Xie C, Yuan J, Li H, et al. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:D98–103.
 151. Yoder J, Pham C, Iizuka Y-M, et al. Requirement for the SLP-76 Adaptor GADS in T Cell Development. *Science*. 2001;291(5510):1987-1991.
 152. An L-L, Li G, Wu K-F, et al. High expression of EDAG and its significance in AML. *Leukemia*. 2005;19(8):1499-1502.
 153. Li CY, Zhan YQ, Xu CW, et al. EDAG regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic cells and resists cell apoptosis through the activation of nuclear factor- κ B. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11(12):1299-1308.
 154. Ling B, Zhou Y, Feng D, et al. Down-regulation of EDAG expression by retrovirus-mediated small interfering RNA inhibits the growth and IL-8 production of leukemia cells. *Oncology Reports*. 2007;18(3):659-664.
 155. Zhao K, Zheng W-W, Dong X-M, et al. EDAG promotes the expansion and survival of human CD34+ cells. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0190794.
 156. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(7):969-980.
 157. Kanno H, Fujii H, Tsujino G, Miwa S: Molecular basis of impaired pyruvate kinase isozyme conversion in erythroid cells: a single amino acid substitution near the active site and decreased mRNA content of the R-type PK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;192:46–52.
 158. Max-Audit I, Testa U, Kechemir D, Titeux M, Vainchenker W, Rosa R. Pattern of pyruvate kinase isozymes in erythroleukemia cell lines and in normal human erythroblasts. *Blood*. 1984;64(4):930-936.
 159. Lenzner C, Nürnberg P, Thiele BJ, et al. Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*. 1994;83(10):2817-2822.
 160. Ben Chih, Liu P, Chinn Y, et al. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nature Cell Biology*. 2012;14(1):61-72.
 161. Jiang X, Zhao Y, Chan WY, Vercauteren S, Blood EP, 2004. Deregulated expression in Ph+ human leukemias of AHI-1, a gene activated by insertional mutagenesis in mouse models of leukemia. *Blood* 2004 May 15;103:3897–3904.
 162. Zhou LL, Zhao Y, Ringrose A, et al. AHI-1 interacts with BCR-ABL and modulates BCR-ABL transforming activity and imatinib response of CML stem/progenitor cells. 2008;205(11):2657-2671.
 163. Weber BN, Chi AW-S, Chavez A, et al. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature*. 2011;476(7358):63-68.
 164. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment.

- Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018;3(1):635.
165. Pan X-N, Chen J-J, Wang L-X, et al. Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e105381.
 166. Saleque S, Kim J, Rooke HM, Orkin SH. Epigenetic Regulation of Hematopoietic Differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b Is Mediated by the Cofactors CoREST and LSD1. *Molecular Cell*. 2007;27(4):562-572.
 167. Saleque S, Cameron S, Orkin SH. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes & Development*. 2002;16(3):301-306. doi:10.1101/gad.959102.
 168. Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry*. 1994;219(3):713-725.
 169. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, et al. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*. 2013;45(8):868-
 170. Godbout M, Erlander MG, Hasel KW, et al. 1G5: a calmodulin-binding, vesicle-associated, protein kinase-like protein enriched in forebrain neurites. *Journal of Neuroscience*. 1994;14(1):1-13.
 171. Takemoto D, Jilka C. Increased content of calmodulin in human leukemia cells. *Leukemia research*. 1983;7(1):97-100.
 172. Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *American Journal of Cancer Research*. 2015;5(4):1281-1294.
 173. Kurayama R, Ito N, Nishibori Y, et al. Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Laboratory Investigation*. 2011;91(7):992-1006.
 174. Grzes KM, Swamy M, Hukelmann JL, Emslie E, Sinclair LV, Cantrell DA. Control of amino acid transport coordinates metabolic reprogramming in T-cell malignancy. *Leukemia*. 2017;31(12):2771-2779.
 175. Yanqiu H, Linjuan C, Jin W, et al. The effects of quercetin and kaempferol on multidrug resistance and the expression of related genes in human erythroleukemic K562/A cells. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(62):13399-13406.
 176. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2004;447(5):619-628.
 177. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiological Reviews*. 1983;63(4):1420-1480.
 178. Knyazev EN, Mal'tseva DV, Zacharyants AA, Zakharova GS, Zhidkova OV, Poloznikov AA. TNF α -Induced Expression of Transport Protein Genes in HUVEC

- Cells Is Associated with Enhanced Expression of Transcription Factor Genes RELB and NFkB2 of the Non-Canonical NF-κB Pathway. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;164(6):757-761.
179. Koh KX, Tan GH, Low SHH, et al. Acquired resistance to PI3K/mTOR inhibition is associated with mitochondrial DNA mutation and glycolysis. *Oncotarget*. 2017;8(66).
 180. Jiang M, Huang O, Xie Z, et al. A novel long non-coding RNA-ARA: Adriamycin Resistance Associated. *Biochemical Pharmacology*. 2014;87(2):254-283.
 181. Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R. The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development*. 2000;127(13):2933-2943.
 182. Sonnet M, Claus R, Becker N, et al. Early aberrant DNA methylation events in a mouse model of acute myeloid leukemia. *Genome Medicine*. 2014;6(4):34.
 183. Parker LH, Schmidt M, Jin S-W, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature*. 2004;428(6984):754-758.
 184. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126. *Development*. 2008;135(24):3989-3993.
 185. Huang C, Li X, Zhou Y, Luo Y, Li C, Yuan X. Expression and clinical significance of EGFL7 in malignant glioma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(11):1737-1743
 186. Hsu T-H, Chu C-C, Jiang S-Y, et al. Expression of the class II tumor suppressor gene RIG1 is directly regulated by p53 tumor suppressor in cancer cell lines. *FEBS Letters*. 2012;586(9):1287-1293
 187. Hsu T-H, Chang T-C. RARRES3 regulates signal transduction through post-translational protein modifications. *Molecular & Cellular Oncology*. 2015;2(4):e999512.
 188. Anderson AM, Kalimutho M, Harten S, Nanayakkara DM, Khanna KK, Ragan MA. The metastasis suppressor RARRES3 as an endogenous inhibitor of the immunoproteasome expression in breast cancer cells. *Scientific Reports*. 2017;7:39873.
 189. Morales M, Arenas EJ, Urosevic J, et al. RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(7):865-881.
 190. Lekstrom-Himes JA. The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *STEM CELLS*. 2001;19(2):125-133.
 191. Gombart AF, Koeffler HP. Neutrophil specific granule deficiency and mutations in the gene encoding transcription factor C/EBP(epsilon). *Current Opinion in Hematology*. 2002;9(1):36-42.
 192. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined

- transcription factors. *Nature*. 2011;476(7359):220-223.
193. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 2010;463(7284):1035-1041.
 194. Cook AL, Sturm RA. POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. - PubMed - NCBI. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2008;21(6):611-626.
 195. Lu Y, Haldar S, Croce K, et al. Kruppel-like Factor 15 Regulates Smooth Muscle Response to Vascular Injury--Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(8):1550-1552
 196. Jung DY, Chalasani U, Pan N, et al. KLF15 Is a Molecular Link between Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77851.
 197. Haldar SM, Lu Y, Jeyaraj D, et al. Klf15 deficiency is a molecular link between heart failure and aortic aneurysm formation. *Science Translational Medicine*. 2010;2(26):26ra26.
 198. Asou H, Matsui H, Ozaki Y, et al. Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;383(2):245-251.
 199. Kim J, Choi DK, Min JS, et al. VBP1 represses cancer metastasis by enhancing HIF-1 α degradation induced by pVHL. *FEBS Journal* 2018 Jan;285:115–126.
 200. Xu Y, Her C. VBP1 facilitates proteasome and autophagy-mediated degradation of MutS homologue hMSH4. *The FASEB Journal*. 2013;27(12):4799-4810.
 201. He Y-Y, Zhang X-H, Ye T-Z, Wu Z-L. Study on the expression of human ERMAP gene in erythropoietic and macrophage differentiation of K562 cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2005;13(4):553-556.
 202. Zhou W, Xu J, Li H, et al. Neddylation E2 UBE2F Promotes the Survival of Lung Cancer Cells by Activating CRL5 to Degrade NOXA via the K11 Linkage. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(4):1104-1116.
 203. Rampazzo C, Gallinaro L, Milanese E, Frigimelica E, Reichard P, Bianchi V. A deoxyribonucleotidase in mitochondria: Involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(15):8239-8244.
 204. Deutsch AJA, Angerer H, Fuchs TE, Neumeister P. The nuclear orphan receptors NR4A as therapeutic target in cancer therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2012;12(9):1001-1014.
 205. Safe S, Jin U-H, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *The Journal of steroid biochemistry*

- and molecular biology*. 2016;157:48-60
206. Beard JA, Tenga A, Chen T. The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer. *Cellular Signalling*. 2015;27(2):257-266.
 207. Li Q-X, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F. NR4A1, 2, 3--an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histology and histopathology*. 2006;21(5):533-540
 208. Ke N, Claassen G, Yu D-H, et al. Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Research*. 2004;64(22):8208-8212.
 209. Beard JA, Tenga A, Hills J, et al. The orphan nuclear receptor NR4A2 is part of a p53-microRNA-34 network. *Scientific Reports*. 2016;6(1):25108.
 210. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-490.
 211. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3331
 212. Levescot A, Flamant S, Basbous S, et al. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Research*. 2014;74(10):2669-2676.
 213. Qin L, Dominguez D, Chen S, et al. Exogenous IL-33 overcomes T cell tolerance in murine acute myeloid leukemia. - PubMed - NCBI. *Oncotarget*. 2016;7(38):61069-61080.
 214. Naeim F, Rao PN, Grody WW (Eds.). Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches, Elsevier, Amsterdam 2008.
 215. Hubmann R, Hilgarth M, Schnabl S, et al. Gliotoxin is a potent NOTCH2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *British Journal of Haematology*. 2013;160(5):618-629.
 216. Barna G, Reiniger L, Tátrai P, Kopper L, Matolcsy A. The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. *Hematological Oncology*. 2008;26(3):167-170.
 217. Marti F, Garcia GG, of PLJ, 2006. Essential role of the T cell-specific adapter protein in the activation of LCK in peripheral T cells. *J Exp Med* 2006;203:281–287.
 218. Marti F, Post NH, Chan E, Experimental PKJ of, 2001. A transcription function for the T cell-specific adapter (TSA_d) protein in T cells: critical role of the TSA_d Src homology 2 domain. *J Exp Med* 2001;193:1425–1430.
 219. Drappa J, Kamen LA, Chan E, et al. Impaired T Cell Death and Lupus-like Autoimmunity in T Cell-specific Adapter Protein-deficient Mice. *The Journal of*

- experimental medicine*. 2003;198(5):809-821..
220. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 1993;74(1):185-195.
 221. Schippers A, Leuker C, Pabst O, et al. Mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. *Gastroenterology*. 2009;137(3):924-933
 222. Neri P, Ren L, Azab AK, et al. Integrin $\beta 7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood*. 2011;117(23):6202-6213.
 223. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 1997;387(6636):921-924.
 224. Kazi JU, Kabir NN, Flores-Morales A, Rönstrand L. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *CMLS*. 2014;71(17):3297-3310.
 225. Duval D, Reinhardt BÉ, Kedinger C, Journal HBTF, 2000. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J*. 2000 Aug;14(11):1577-84.
 226. Sasi W, Sharma AK, Mokbel K. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Molecular Biology International*. 2014;2014(1):630797.
 227. Demirel Ö, Balló O, Reddy PNG, et al. SOCS1 function in BCR-ABL mediated myeloproliferative disease is dependent on the cytokine environment. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0180401.
 228. Chai JH, Zhang Y, Tan WH, Chng WJ, Li B, Wang X. Regulation of hTERT by BCR-ABL at multiple levels in K562 cells. *BMC Cancer*. 2011;11(1):512.
 229. Rojo JM, Portolés P. Class I phosphoinositide 3-kinases in immunity: Effect of inhibitors in immune and autoimmune reactions. *Anales De La Real Academia De Farmacia*. 80(1):91-125.
 230. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2014;370(11):997-1007.
 231. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2006;54(1):15-24.
 232. Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006;442(7101):461-465.
 233. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-258.
 234. Wu T, Wang L-N, Tang D-R, Sun F-Y. SOST silencing promotes proliferation and invasion and reduces apoptosis of retinoblastoma cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Gene therapy*. 2017;24(7):399-407.

235. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(29):26770-26775.
236. Jeong B-C, Kim TS, Kim H-S, Lee S-H, Choi Y. Transmembrane protein 64 reciprocally regulates osteoblast and adipocyte differentiation by modulating Wnt/ β -catenin signaling. *Bone*. 2015;78:165-173.
237. Chariot A, Leonardi A, Müller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U. Association of the Adaptor TANK with the I κ B Kinase (IKK) Regulator NEMO Connects IKK Complexes with IKK ϵ and TBK1 Kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37029-37036.
238. Wang W, Huang X, Xin H-B, Fu M, Xue A, Wu Z-H. TRAF Family Member-associated NF- κ B Activator (TANK) Inhibits Genotoxic Nuclear Factor κ B Activation by Facilitating Deubiquitinase USP10-dependent Deubiquitination of TRAF6 Ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(21):13372-13385.
239. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF- κ B p50 ubiquitination blockade. *Science*. 2007;317(5838):675-678.
240. Caamaño JH, Perez P, Lira SA, Bravo R. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF- κ B1 (p50) homodimers in vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(4):1342-1348.
241. Corn RA, Hunter C, Liou H-C, Siebenlist U, Boothby MR. Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *The Journal of Immunology*. 2005;175(4):2102-2110.
242. Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS. Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes & Development*. 2006;20(2):225-235.
243. Mathas S, Johrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F. Elevated NF- κ B p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 106(13):4287-4293.
244. Brenne AT, Fagerli UM, Shaughnessy JD, et al. High expression of BCL3 in human myeloma cells is associated with increased proliferation and inferior prognosis. *European Journal of Haematology*. 2009;82(5):354-363.
245. Herrington FD, Nibbs RJB. Regulation of the Adaptive Immune Response by the I κ B Family Protein Bcl-3. *Cells*. 2016;5(2).
246. Koller G, Schlomann U, Current PG, 2009. ADAM8/MS2/CD156, an emerging drug target in the treatment of inflammatory and invasive pathologies. *Curr Pharm Des* 2009;15:2272–2281.
247. Roodman GD. Regulation of Osteoclast Differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068(1):100-109.
248. Wildeboer D, Naus S, Amy Sang Q-X, Bartsch JW, Pagenstecher A. Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in

- human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65(5):516-527.
249. Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, et al. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(24):8363-8370.
250. Miyauchi M, Koya J, Arai S, et al. ADAM8 Is an Antigen of Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells Identified by Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports*. 2018;10(3):1115-1130.
251. Baker SJ. Small Unstable Apoptotic Protein, an Apoptosis-associated Protein, Suppresses Proliferation of Myeloid Cells. *Cancer Research*. 2003;63(3):705-712.
252. Kelley KD, Miller KR, Todd A, Kelley AR, Tuttle R, Berberich SJ. YPEL3, a p53-regulated gene that induces cellular senescence. *Cancer Research*. 2010;70(9):3566-3575.
253. Ishibashi K, Fujita N, Kanno E, et al. Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12–5-16L2 complex. *Autophagy*. 2014;7(12):1500-1513.
254. Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Molecular Cancer*. 2010;9(1):44. doi:10.1186/1476-4598-9-44.
255. Kaminski WE, Orsó E, Diederich W, Klucken J, Drobnik W, Schmitz G. Identification of a Novel Human Sterol-Sensitive ATP-Binding Cassette Transporter (ABCA7). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;273(2):532-538.
256. Tomioka M, Toda Y, Mañucat NB, et al. Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(7):658-665.
257. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology*. 2018;68(2):280-295.
258. Pastores GM, Hughes DA. Lysosomal Storage Disorders and Malignancy. *Diseases*. 2017;5(1):8.
259. DemGene, Steinberg S, Stefansson H, et al. Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. 2015;47(5):445-447.
260. Abramovich C, Shen W-F, Pineault N, et al. Functional Cloning and Characterization of a Novel Nonhomeodomain Protein That Inhibits the Binding of PBX1-HOX Complexes to DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(34):26172-26177.
261. Manavathi B, Lo D, Bugide S, et al. Functional Regulation of Pre-B-cell Leukemia Homeobox Interacting Protein 1 (PBXIP1/HPIP) in Erythroid Differentiation.

- Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(8):5600-5614.
262. Navarrete-Meneses M del P, Pérez-Vera P. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)*. 2017;74(4):243-264.
263. Bugide S, Gonugunta VK, Penugurti V, Malisetty VL, Vadlamudi RK, Manavathi B. HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation. *Cellular oncology* 2017;40(2):133-144.
264. Van Vuurden DG, Aronica E, Hulleman E, et al. Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 is overexpressed in astrocytoma and promotes tumor cell growth and migration. *Neuro-Oncology*. 2014;16(7):946-959.
265. Bugide S, David D, Nair A, et al. Hematopoietic PBX-interacting protein (HPIP) is over expressed in breast infiltrative ductal carcinoma and regulates cell adhesion and migration through modulation of focal adhesion dynamics. *Oncogene* 2014;34(35):4601-4612.
266. Tsuchida N, Ikeda M-A, Ishino Y, Grieco M, Vecchio G. FUCA1 is induced by wild-type p53 and expressed at different levels in thyroid cancers depending on p53 status. *International journal of oncology*. 2017;50(6):2043-2048.
267. Baudot AD, Crighton D, O'Prey J, Somers J, Sierra Gonzalez P, Ryan KM. p53 directly regulates the glycosidase FUCA1 to promote chemotherapy-induced cell death. *Cell Cycle*. 2016;15(17):2299-2308.
268. Yim E-K, Peng G, Dai H, et al. Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell*. 2009;15(4):304-314.
269. Kim J-L, Ha G-H, Campo L, et al. The role of Rak in the regulation of stability and function of BRCA1. *Oncotarget*. 2017;8(49):86799-86815.
270. Goel RK, Lukong KE. Understanding the cellular roles of Fyn-related kinase (FRK): implications in cancer biology. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2016;35(2):179-199.
271. Deryugina EI, Zajac E, Zilberberg L, et al. LTBP3 promotes early metastatic events during cancer cell dissemination. *Oncogene*. 2018;37(14):1815-1829.
272. Mezzadra R, Sun C, Jae LT, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature*. 2017;549(7670):106-110.
273. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *The Journal of Cell Biology*. 2010;189(2):223-232.
274. Biesemann A, Gorontzi A, Barr F, Gerke V. Rab35 protein regulates evoked exocytosis of endothelial Weibel-Palade bodies. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(28):11631-11640
275. Qu X, Davison J, Du L, et al. Identification of differentially methylated markers

- among cytogenetic risk groups of acute myeloid leukemia. *Epigenetics*. 2015;10(6):526-535.
276. Boiko AD, Porteous S, Razorenova OV, Krivokrysenko VI, Williams BR, Gudkov AV. A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. *Genes & Development*. 2006;20(2):236-252.
277. Rouault JP, Falette N, Guéhenneux F, et al. Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nature Genetics*. 1996;14(4):482-486.
278. MAO B, ZHANG Z, Wang G. BTG2: a rising star of tumor suppressors. *International journal of oncology*. 2015;46(2):459-464.
279. Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(25):15034-15044.
280. Passeri D, Marcucci A, Rizzo G, et al. Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(13):5023-5032.
281. Dolezal E, Infantino S, Drepper F, et al. The BTG2-PRMT1 module limits pre-B cell expansion by regulating the CDK4-Cyclin-D3 complex. *Nature Immunology*. 2017;18(8):911-920.
282. Mandal M. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(4):603-614.
283. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death and Differentiation*. 2012;19(1):67-74.
284. Macaire H, Riquet A, Moncollin V, et al. Tax Protein-induced Expression of Antiapoptotic Bfl-1 Protein Contributes to Survival of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)-infected T-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(25):21357-21370.
285. Tan BS, Tiong KH, Choo HL, et al. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). *Cell Death and Disease*. 2015;6(7):e1826.
286. Contreras AU, Mebratu Y, Delgado M, et al. Deacetylation of p53 induces autophagy by suppressing Bmf expression. *The Journal of Cell Biology*. 2013;201(3):427-437.
287. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001;293(5536):1829-1832.
288. Shao Y, Aplin AE. ERK2 phosphorylation of serine 77 regulates Bmf pro-apoptotic

- activity. *Cell Death and Disease*. 2012;3(1):e253.
289. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7908-7916.
290. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, et al. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. 2015;162(6):1257-1270.
291. Almlöf JC, Alexsson A, Imgenberg-Kreuz J, et al. Novel risk genes for systemic lupus erythematosus predicted by random forest classification. *Scientific Reports*. 2017;7(1):6236.
292. Li Z, Tan H, Shi Y, et al. Global Gene Expression Patterns and Somatic Mutations in Sporadic Intracranial Aneurysms. *World Neurosurgery*. 2017;100:15-21.
293. Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GG. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*. 1996;135(4):991-1007.
294. Sonnenberg A, Liem RKH. Plakins in development and disease. *Experimental Cell Research*. 2007;313(10):2189-2203.
295. Pang X-Y, Cao J, Addington L, et al. Structure/function relationships of adipose phospholipase A2 containing a cys-his-his catalytic triad. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(42):35260-35274.
296. Esteghamat F, van Dijk TB, Braun H, et al. The DNA binding factor Hmg20b is a repressor of erythroid differentiation. *Haematologica*. 2011;96(9):1252-1260.
297. Li L, Liang S, Wasylshen AR, et al. PLA2G16 promotes osteosarcoma metastasis and drug resistance via the MAPK pathway. *Oncotarget*. 2016;7(14):18021-18035.
298. Xiong S, Tu H, Kollareddy M, et al. Pla2g16 phospholipase mediates gain-of-function activities of mutant p53. *PNAS* 2014;111(30):11145-11150.
299. Wang Z, Yang B, Zhang M, et al. lncRNA Epigenetic Landscape Analysis Identifies EPIC1 as an Oncogenic lncRNA that Interacts with MYC and Promotes Cell-Cycle Progression in Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(4):706-720.
300. Elias S, Yamin R, Golomb L, et al. Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014;123(10):1535-1543.
301. Boles NC, Lin KK, Lukov GL, Bowman TV, Baldrige MT, Goodell MA. CD48 on hematopoietic progenitors regulates stem cells and suppresses tumor formation. *Blood*. 2011;118(1):80-87.
302. Ronchetti D, Agnelli L, Pietrelli A, et al. A compendium of long non-coding RNAs transcriptional fingerprint in multiple myeloma. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3337.
303. Guastadisegni MC, Lonoce A, Impera L, et al. CBFA2T2 and C20orf112: two novel fusion partners of RUNX1 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. June 2010:1-4.
304. Borah S, Barrodia P, Swain RK. Nucleolar protein 4-like has a complex expression pattern in zebrafish embryos. *The International journal of developmental biology*. 2016;60(1):53-56.

305. Neveu B. Caractérisation de la régulation des nouvelles cibles transcriptionnelles du facteur de transcription ETV6 dans la leucémie lymphoblastique aiguë. <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/20242> 2018.
306. Rahman MA, Liess L, Lellahi MS, et al. Abstract 2101: The transcription factor POU3F2 is expressed in human gliomas and promotes tumorigenesis in vivo. *Cancer Research*. 2015;75(15):2101.
307. Nazarenko I, Kristiansen G, Fonfara S, et al. H-REV107-1 Stimulates Growth in Non-Small Cell Lung Carcinomas via the Activation of Mitogenic Signaling. *The American Journal of Pathology*. 2006;169(4):1427-1439.
308. Ueda N, Yamashita R, Yamamoto S, Ishimura K. Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakaryoblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1344(1):103-110.
309. Qian Q, Lv Y, Li P. SOCS1 is associated with clinical progression and acts as an oncogenic role in triple-negative breast cancer. *IUBMB Life*. 2018;70(4):320-327.
310. Shin J-M, Jeong Y-J, Cho H-J, Magae J, Bae Y-S, Chang Y-C. Suppression of c-Myc induces apoptosis via an AMPK/mTOR-dependent pathway by 4-O-methyl-ascochlorin in leukemia cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2016;21(5):657-668.
311. Duesberg P, McCormack A. Immortality of cancers. *Cell Cycle*. 2014;12(5):783-802.
312. Mahoney ET, Benton RL, Maddie MA, Whittemore SR, Hagg T. ADAM8 is selectively up-regulated in endothelial cells and is associated with angiogenesis after spinal cord injury in adult mice. *The Journal of comparative neurology*. 2009;512(2):243-255.
313. Guaiquil VH, Swendeman S, Zhou W, et al. ADAM8 is a negative regulator of retinal neovascularization and of the growth of heterotopically injected tumor cells in mice. *Journal of Molecular Medicine*. 2010;88(5):497-505.
314. Romagnoli M, Mineva ND, Polmear M, et al. ADAM8 expression in invasive breast cancer promotes tumor dissemination and metastasis. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(2):278-294
315. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, et al. Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;267(1):245-251.
316. Simmons JL, Pierce CJ, Al-Ejeh F, Boyle GM. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. *Scientific Reports*. 2017;7(1):10909.
317. Vecchio G, Parascandolo A, Allocca C, Oncotarget CU, 2017. Human α -L-fucosidase-1 attenuates the invasive properties of thyroid cancer. *ncbi.nlm.nih.gov*.
318. Lim DH, Kim WS, Kim SJ, Yoo HY, Ko YH. Microarray Gene-expression

- Profiling Analysis Comparing PCNSL and Non-CNS Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Anticancer research*. 2015;35(6):3333-3340.
319. Lee WTY, St John J. The control of mitochondrial DNA replication during development and tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1350(1):95-106.
320. Lin C-S, Wang L-S. Mitochondrial DNA instability in human cancers. *Formosan Journal of Surgery*. 2013;46(3):71-75.
321. Shapovalov Y, Hoffman D, Zuch D, de Mesy Bentley KL, Eliseev RA. Mitochondrial Dysfunction in Cancer Cells Due to Aberrant Mitochondrial Replication. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(25):22331-22338.
322. Burr ML, Sparbier CE, Chan Y-C, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature*. 2017;549(7670):101-105.
323. Ferris R. PD-1 targeting in cancer immunotherapy. *Cancer* 2013 Dec 1;119:E1-3.
324. Li Z, Dong P, Ren M, et al. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *Journal of Cancer*. 2016;7(7):784-793.
325. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252-264.
326. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(57).
327. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867.
328. Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015;40:72-81.
329. Martinez-Outschoorn UE, Curry JM, Ko Y-H, et al. Oncogenes and inflammation rewire host energy metabolism in the tumor microenvironment: RAS and NFκB target stromal MCT4. *Cell Cycle*. 2013;12(16):2580-2597.
330. Majumder M, Nandi P, Omar A, Ugwuagbo KC, Lala PK: EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer. *IJMS* 2018;19:1019.
331. Dwyer-Nield LD, Srebernak MC, Barrett BS, et al. Cytokines differentially regulate the synthesis of prostanoid and nitric oxide mediators in tumorigenic versus non-tumorigenic mouse lung epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1196-1206.
332. Cebola I, Peinado MA. Epigenetic deregulation of the COX pathway in cancer. *Progress in Lipid Research*. 2012;51(4):301-313.
333. Boettcher S, Gerosa RC, Radpour R, et al. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood*. 2014;124(9):1393-1403.
334. Keith RL, Geraci MW, Nana-Sinkam SP, et al. Prostaglandin E2 receptor subtype

- 2 (EP2) null mice are protected against murine lung tumorigenesis. *Anticancer research*. 2006;26(4):2857-2861.
335. Kennedy BM, Harris RE. Cyclooxygenase and lipoxygenase gene expression in the inflammogenesis of breast cancer. *Inflammopharmacology*. 2018;357(2):539.
336. Fhu CW, Graham AM, Yap CT, et al. Reed-Sternberg cell–derived lymphotoxin- α activates endothelial cells to enhance T-cell recruitment in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2014;124(19):2973-2982.
337. Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, et al. The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(6):2075-2086.
338. Vassen L, Beauchemin H, Lemsaddek W, Krongold J, Trudel M, Möröy T. Growth Factor Independence 1b (Gfi1b) Is Important for the Maturation of Erythroid Cells and the Regulation of Embryonic Globin Expression. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e96636. doi:10.1371/journal.pone.0096636.
339. Gautier E-F, Ducamp S, Leduc M, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Reports*. 2016;16(5):1470-1484.
340. Lausen J, Pless O, Leonard F, Kuvardina ON, Koch B, Leutz A. Targets of the Tal1 transcription factor in erythrocytes: E2 ubiquitin conjugase regulation by Tal1. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(8):5338-5346.
341. Jim JH. Identification of Target Genes of an Erythroid Transcription Factor Complex Containing SCL (TAL1), <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/resources/theses/jim/abstract.pdf> , abgerufen 05.10.2015
342. Tu X, Rhee Y, Condon KW, et al. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*. 2012;50(1):209-217.
343. Pietrzyk B, Smertka M, Chudek J. Sclerostin: Intracellular mechanisms of action and its role in the pathogenesis of skeletal and vascular disorders. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017;26(8):1283-1291.
344. Sebastian A, Loots GG. Transcriptional control of Sost in bone. *Bone*. 2017;96:76-84.
345. Bussmann J, Bakkers J, Schulte-Merker S. Early endocardial morphogenesis requires Scl/Tal1. *PLoS Genetics*. 2007;3(8):e140.
346. Muroyama Y, Fujiwara Y, Orkin SH, Rowitch DH. Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature*. 2005;438(7066):360-363.
347. Gillis LC, Berry DM, Minden MD, McGlade CJ, Barber DL: Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is required for BCR-ABL-mediated lymphoid leukemia. *Leukemia* 2013;27:1666–1676.

348. Wang W, Li N-N, Du Y, Lv F-F, Lin G-Q: FoxO3a and nilotinib-induced erythroid differentiation of CML-BC cells. *Leukemia research* 2013;37:1309–1314.
349. Kassouf MT, Hughes JR, Taylor S, McGowan SJ, Soneji S, Green AL, et al.: Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res* 2010;20:1064–1083.
350. Benyoucef A, Calvo J, Renou L, Arcangeli M-L, van den Heuvel A, Amsellem S, et al.: The SCL/TAL1 Transcription Factor Represses the Stress Protein DDIT4/REDD1 in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *STEM CELLS* 2015;33:2268–2279.
351. Astolfi A, Vendemini F, Urbini M, Melchionda F, Masetti R, Franzoni M, et al.: MYCN is a novel oncogenic target in pediatric T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Oncotarget* 2013 Sep 30;5:120-130.
352. Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, Baer R: The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* 1994;9:3713–3716.
353. Tang T, Arbiser JL, Brandt SJ: Phosphorylation by mitogen-activated protein kinase mediates the hypoxia-induced turnover of the TAL1/SCL transcription factor in endothelial cells. *JBC* 2002;277:18365–18372.
354. Talora C, Cialfi S, Oliviero C, Palermo R, Pascucci M, Frati L, et al.: Cross talk among Notch3, pre-TCR, and Tal1 in T-cell development and leukemogenesis. *Blood* 2006;107:3313–3320.
355. Jin S, Tran N-T, Su H, Huang S, Zhao X, Liu Y: The TAL1 Short Isoform Generated By PRMT1-Mediated Alternative RNA Splicing Promotes Erythroid Differentiation. *Blood* 2016;128:1249–1249.
356. Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, et al.: Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res* 2005;65:3735–3744.
357. Van Handel B, Montel-Hagen A, Sasidharan R, Nakano H, Ferrari R, Boogerd CJ, et al.: Scl represses cardiomyogenesis in prospective hemogenic endothelium and endocardium. *Cell* 2012;150:590–605.
358. Yamashita M, Nitta E, Suda T: Regulation of hematopoietic stem cell integrity through p53 and its related factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2016;1370:45–54.
359. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL: The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med* 2000;191:253–264.
360. Métais J-Y, Winkler T, Geyer JT, Calado RT, Aplan PD, Eckhaus MA, et al.: BCL2A1a over-expression in murine hematopoietic stem and progenitor cells decreases apoptosis and results in hematopoietic transformation. *PLoS ONE*

- 2012;7:e48267.
361. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, et al.: Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics* 1999;21: 220–224.
 362. Ribatti D: Is angiogenesis essential for the progression of hematological malignancies or is it an epiphenomenon? *Leukemia* 2009;23:433–434.
 363. Wellbrock J, Fiedler W: Clinical experience with antiangiogenic therapy in leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:1053–1068.
 364. Cogle CR, Bosse RC, Brewer T, Migdady Y, Shirzad R, Kampen KR, et al.: Acute myeloid leukemia in the vascular niche. *Cancer Letters* 2016;380:552–560.
 365. Goodwin ML, Gladden LB, Nijsten MWN, Jones KB: Lactate and Cancer: Revisiting the Warburg Effect in an Era of Lactate Shuttling. *Front Nutr* 2015;1:397.
 366. San-Millan I, Brooks GA: Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis* 2017;38:119–133.
 367. Hui L, Chen Y: Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters* 2015;368:7–13.
 368. Ansell SM, Vonderheide RH: Cellular composition of the tumor microenvironment. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013;33:e91–e97.

12. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel


"Identifizierung von neuen Zielgenen des Transkriptionsfaktors TAL1"

im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Winfried Wels mit Unterstützung durch Herrn Dr. Jörn Lausen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

FFM, 4.9.2018

(Ort, Datum)



(Unterschrift)