

**DAS MLL-PROTEIN IN DER ROLLE ALS TRANSKRIPTIONELLER  
AKTIVATOR ODER REPRESSOR  
UND DAS PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONSNETZWERK  
DER HUMANEN AF4-/AF4·MLL-MULTIPROTEINKOMPLEXE**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. phil. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Tanja Zwicker, geb. Rößler

aus Heppenheim (Bergstraße)

Frankfurt am Main, 2014

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Fürst

Datum der Disputation: 14.01.2015

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Mögliche getan hat.

*Johann Wolfgang von Goethe*

*Für meine Eltern Claudia und Freddy.*

*Für meinen Bruder Oliver.*

*Für Benni.*

---

# I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>III. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1 Leukämie	3
2.2 Ursachen und genetische Grundlagen von Leukämien	4
2.3 Aberrationen des <i>MLL</i> -Gens	7
2.3.1 Die Translokation t(4;11)(q21;q23)	10
2.4 Wildtypprotein <i>MLL</i>	11
2.4.1 PHD-Finger des <i>MLL</i> -Proteins	15
2.4.2 Alternative Spleißvarianten des <i>MLL</i> -Gens	17
2.5 Wildtypprotein <i>AF4</i>	19
2.6 Fusionsproteine <i>MLL</i> • <i>AF4</i> und <i>AF4</i> • <i>MLL</i>	21
2.6.1 Fusionsprotein <i>MLL</i> • <i>AF4</i>	22
2.6.2 Fusionsprotein <i>AF4</i> • <i>MLL</i>	24
2.7 Komponenten des <i>AF4</i> -MPC und <i>AF4</i> • <i>MLL</i> -MPC im Vergleich	26
2.7.1 Beteiligung viraler Proteine am Beispiel des HIV-1 Tat-Proteins	28
2.8 Relevanz viraler Proteine für Krebserkrankungen	29
2.8.1 Humanes Zytomegalievirus	29
2.8.2 Epstein-Barr-Virus	30
2.8.3 Humane Papillomviren	30
<b>3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>31</b>

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
4.1	<i>Yeast Two-Hybrid System</i>	33
4.2	<b>MLL PHD-Finger</b>	37
4.2.1	MLL PHD3-Varianten	37
4.2.2	Semiquantitative RT-PCR-Experimente mit den PHD3-Varianten	37
4.2.3	MLL PHD1-3	39
4.2.4	Y2H-Experimente mit PHD3, PHD1-3 und CYP33	39
4.2.5	CoIP-Experimente mit PHD3, PHD1-3 und CYP33	43
4.3	<b>Funktionelle Charakterisierung des AF4- und AF4·MLL-MPC</b>	46
4.3.1	Y2H-Experimente	46
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
5.1	<b>PHD-Finger-Domänen</b>	58
5.1.1	PHD3 – 4 Varianten mit unterschiedlicher Funktion?	58
5.1.2	PHD1-3 – Konsequenz der verkürzten Variante	64
5.2	<b>Protein-Interaktionsnetzwerk des AF4- und AF4·MLL-MPC</b>	69
5.2.1	Beteiligung viraler Proteine am AF4- und AF4·MLL-MPC	75
5.2.2	Weiterführende Untersuchungen	77
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>78</b>
6.1	<b>Material</b>	78
6.1.1	Chemikalien	78
6.1.2	Kits	80
6.1.3	Größenmarker	80
6.1.4	Enzyme	80
6.1.5	Verbrauchsmaterialien	80
6.1.6	Geräte	81
6.1.7	Puffer & Lösungen	82
6.1.8	Organismen und Nährmedien	84

---

---

6.1.9	Synthetische Oligonukleotide	86
6.1.10	Plasmidvektoren	91
6.1.11	Antikörper	92
<b>6.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>93</b>
6.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	93
6.2.2	Zellbiologische Methoden - Arbeiten mit Hefen	94
6.2.3	Zellbiologische Methoden - Arbeiten mit Säugerzellen	95
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>121</b>
9.1	Lebenslauf	121
9.2	Publikationen und Vorträge	121
9.2.1	Publikationen	121
9.2.2	Vorträge	121
9.3	Danksagung	122
9.4	Eidesstattliche Erklärung	122

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Inzidenz der häufigsten TPGs in <i>MLL</i> -Rearrangements	9
Abbildung 2-2: Das <i>MLL</i> -Protein	12
Abbildung 2-3: Proteolytische Spaltung des <i>MLL</i> -Proteins	12
Abbildung 2-4: PHD-Finger des <i>MLL</i> -Proteins	17
Abbildung 2-5: Das <i>AF4</i> -Protein	20
Abbildung 2-6: Das <i>MLL</i> · <i>AF4</i> -Protein	22
Abbildung 2-7: Das <i>AF4</i> · <i>MLL</i> -Protein	25
Abbildung 2-8: Schematische Darstellung <i>MLL</i> -, <i>AF4</i> - und <i>AF4</i> · <i>MLL</i> -Multiproteinkomplexe	27
Abbildung 2-9: Der Tatcom1-Komplex	28
Abbildung 4-1: Das Y2H-Prinzip I	34
Abbildung 4-2: Das Y2H-Prinzip II	36
Abbildung 4-3: <i>MLL</i> PHD3-Varianten	38
Abbildung 4-4: Y2H- <i>Mating</i> - PHD3 x PHD3 und CYP33	41
Abbildung 4-5: Y2H- <i>Mating</i> - PHD1-3 x PHD3, PHD1-3 und CYP33	42
Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der aus pDFG und pDHC gebildeten Proteine	43
Abbildung 4-7: CoIP - CYP33 und CYP33 RRM mit PHD3 und PHD1-3	46
Abbildung 4-8: Ergebnisse des Y2H- <i>Mating</i> mit Proteinen des <i>AF4</i> und <i>AF4</i> · <i>MLL</i> -MPC	51
Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der in Abbildung 4-8 gezeigten Interaktionen	54
Abbildung 5-1: <i>MLL</i> PHD3-Varianten und ihre Funktionen I	59
Abbildung 5-2: <i>MLL</i> als transkriptioneller Aktivator und Repressor	61
Abbildung 5-3: <i>MLL</i> PHD3-Varianten und ihre Funktionen II	63
Abbildung 5-4: <i>MLL</i> PHD-Struktur durch Anordnung der Cysteine und Histidine	65
Abbildung 5-5: Einfluss des Bruchpunkts auf die Funktion der PHD1-3-Domäne	69
Abbildung 5-6: Zusammenfassung der Y2H-Experimente mit den <i>AF4</i> -/ <i>AF4</i> · <i>MLL</i> -Proteinen	74
Abbildung 5-7: Y2H-Ergebnisse für die <i>AF4</i> -/ <i>AF4</i> · <i>MLL</i> -Proteine inklusive viraler Proteine	76

## III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4-1: Eigenschaften der Expressionsvektoren für das Y2H-System	35
Tabelle 4-2: Modifizierung der pGADT7- und pGBKT7-MCS	35
Tabelle 4-3: Reportergene und ihre Merkmale	47
Tabelle 6-1: Zusammensetzung der PEI-Transfektionslösung	96
Tabelle 6-2: Volumen Lysispuffer für eine Gewebekulturschale	96
Tabelle 6-3: Antikörper für die CoIP und ihre Konzentrationen	97

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland erhalten jährlich etwa 12.500 Patienten die Diagnose Leukämie. Unter ihnen befinden sich ca. 6 % Kinder, welche mit 33,8 % den größten Anteil der kindlichen Krebsneuerkrankungen repräsentieren. Die überwiegende Form im Kindesalter ist die akute lymphatische Leukämie (ALL), deren genetische Ursache meistens in einem hyperdiploiden Karyotyp oder einer chromosomalen Translokation zu finden ist. Bei 8 % der pädiatrischen ALLs ist ein Rearrangement des *MLL*-Gens involviert. Unter Beteiligung des häufigsten Translokationspartnergens (TPG) *AF4* entsteht die t(4;11)(q21;q23)-Translokation mit den beiden Fusionsproteinen AF4·MLL sowie MLL·AF4. Die Therapie erfolgt in der Regel gemäß Hochrisikoprotokollen aufgrund der extrem schlechten Prognose und der mit hoher Therapieresistenz assoziierten Rezidivrate. Eine Studie zur Korrelation zwischen klinischen Merkmalen und molekularen Charakteristika belegte die Abhängigkeit des *Outcomes* von der Verteilung des Bruchpunkts im *MLL*-Gen. Bei älteren Patienten treten die Bruchpunkte überwiegend in *MLL* Intron 9 oder 10 auf und bedeuten eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu den besonders bei Säuglingen präsenten Bruchpunkten im *MLL* Intron 11. Die damit verbundene Verkürzung der *Plant Homeodomain* (PHD) 1 kann neben einer modifizierten Funktion des PHD1 auch in einer veränderten Konformation der gesamten PHD-Domäne resultieren. Besondere Bedeutung hat die PHD1-3-Domäne wegen der Fähigkeit des PHD3 einerseits H3K4<sub>me</sub>-Signaturen zu erkennen und auf der anderen Seite mit CYP33 zu interagieren. Die mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziierten H3K4<sub>me</sub>-Signaturen sowie die CYP33-vermittelte repressive Aktivität bedingen einen ambivalenten Charakter des MLL-Proteins. Daneben ist der PHD3 allein interessant wegen des Vorkommens von 4 differenten Varianten mit keinen, 3, 11 oder 14 fehlenden Aminosäuren, welche durch alternatives Spleißen an der *MLL* Exon 15/16-Verknüpfung entstehen (PHD3-0, PHD3-3, PHD3-11 und PHD3-14). Semiquantitative Bestimmungen in verschiedenen Zelllinien verdeutlichen die nahezu ähnliche Transkription aller 4 Varianten. Weiterführende Untersuchungen mit dem *Yeast Two-Hybrid* (Y2H)-System sowie folgende Koimmunpräzipitations (CoIP)-Experimente zeigten, dass der PHD3-0 die beste Dimerisierungsfähigkeit aufweist. Dagegen ist der am schlechtesten dimerisierende PHD3-3 allein in der Lage, CYP33 bzw. dessen RRM-Domäne zu binden. Die Interaktion mit

inhibitorischen Proteinen und die folgende Funktion als transkriptioneller Repressor sind allein mit der PHD3-3-Variante möglich. Bei Betrachtung der gesamten PHD1-3-Domäne sowie deren verkürzter Variante ( $\Delta$ PHD1-3) fällt die reduzierte Bindungsfähigkeit der  $\Delta$ PHD1-3-Domäne an die CYP33 RRM-Domäne sowie deren fehlende Dimerisierung auf. Über die resultierende geringere Bindung an inhibitorische Proteine kann die transkriptionell repressive Aktivität reduziert werden, während die transkriptionell aktive Funktion an Bedeutung gewinnt.

Neben der Untersuchung der PHD-Domänen des MLL-Proteins wurde das Y2H-System zur weiteren Aufklärung der AF4- und AF4·MLL-Multiproteinkomplexe (MPC) verwendet. Ähnlich den Wildtypproteinen MLL und AF4 sind auch die beiden aus der t(4;11)(q21;q23)-Translokation resultierenden Fusionsproteine an der Assemblierung von MPCs beteiligt. Besonders das reziproke AF4·MLL scheint bezüglich des Therapieerfolgs für die Leukämogenese entscheidend zu sein. Die Identifizierung und Verifizierung sowohl bekannter als auch neuer Komponenten der AF4- und AF4·MLL-MPCs gelang in verschiedenen Experimenten. Allerdings wurde meist nur die Präsenz der Proteine im MPC nachgewiesen. Die Y2H-Untersuchungen konnten Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen der Komplex identifizieren und damit die Kenntnis über die Zusammensetzung der MPCs wesentlich erweitern und vertiefen.

Aufgrund der Beteiligung viraler Proteine an der Krebsentstehung sowie der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle für die virale Replikation erscheint auch die Nutzung der Superelongationskomplexe (SEC) durch virale Proteine plausibel. Die Funktion des AF4-Proteins als Kofaktor von viralen Proteinen, besonders der HCMV und EBV *immediate early* (IE)-Proteine, wurde bereits gezeigt. Außerdem konnte der Einfluss des HCMV IE1 auf AF4-abhängige Effekte sowie dessen Beteiligung am AF4-MPC nachgewiesen werden. Mithilfe der Y2H-Experimente konnten nicht nur Interaktionen des HCMV IE1 sondern auch Wechselwirkungen der Onkoproteine E6/E7 des HPV mit den Proteinen der AF4- und AF4·MLL-MPCs identifiziert werden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 LEUKÄMIE

Im Jahr 2011 gab es ca. 484.000 Krebsneuerkrankungen in Deutschland, von denen ca. 12.500 Patienten [1] die Diagnose Leukämie erhielten, darunter ca. 6 % Kinder unter 15 Jahren. Die Tendenz im Vergleich zu den Vorjahren ist steigend und auch die aktuelle Prognose für 2014 deutet auf eine weitere Erhöhung der Krebsneuerkrankungen hin [2] [3] [4]. Im Jahr 2011 lag die Mortalität aller Krebserkrankungen bei ca. 45 %, während sie bei Leukämien ca. 60 % ausmachte [1]. Im Erwachsenenalter liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 50 %, wobei eine vollständige Heilung nur selten vorkommt. Mit 84 % ist die 5-Jahres-Überlebensrate bei Kinderleukämien wesentlich besser [3] [4].

Die Bezeichnung Leukämie stammt von den altgriechischen Wörtern *λευκός* „weiß“ und *αἷμα* „das Blut“ [5] und bezeichnet die bösartige Neubildung des lymphatischen, blutbildenden und verwandten Gewebes entsprechend der ICD-10-GM-2014 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, *German Modification*, Version 2014) [6].

Erstmals beschrieben wurde das Krankheitsbild der Leukämie 1827, aber erst 1845 führte Rudolf Virchow den Namen *Leukhemia* ein. Zeitgleich veröffentlichten John Hughes Bennett, David Craigie und Alfred Donné vergleichbare Fallberichte.

Basierend auf dem Krankheitsverlauf unterscheidet man akute von chronischen Leukämien und ausgehend vom Zelltyp, aus dem sie entstehen, wird in lymphatische und myeloische Leukämien unterteilt. Während die Differenzierung zwischen akut und chronisch 1889 von Wilhelm Ebstein eingeführt wurde, geht die Unterscheidung nach dem betroffenen Zelltyp ab 1900 auf Otto Naegli zurück, wobei Paul Ehrlich bereits 1880 lymphoide und myeloide Leukämien klassifizierte [7] [8].

Letztendlich erhält man die folgenden vier Haupttypen, wobei 18 % nicht näher zugeordnet werden können: Akute lymphatische Leukämie (ALL, ICD-10 C91.0, 8 %), chronische lymphatische Leukämie (CLL, ICD-10 C91.1, 37 %), akute myeloische Leukämie (AML, ICD-10 C92.0, 27 %) und chronische myeloische Leukämie (CML, ICD-10 C92.1, 10 %). Weitere Formen von Leukämie kommen sehr selten vor [3] [6].

Im Jahr 2010 waren in Deutschland unter allen neu diagnostizierten Leukämien mehr als ein Drittel CLL-Patienten und mehr als ein Viertel AML-Patienten [3].

Die akuten Leukämien lassen sich morphologisch nach der *French American British* (FAB)-Klassifikation einteilen. Während bei der ALL drei Subtypen (L1-L3) unterschieden werden, gibt es für die AML acht Gruppen (M0-M7) mit distinkten Untergruppen [5] [9]. Weiterentwickelt wurde dieses System von der WHO, die bei der AML unter anderem chromosomale Aberrationen in die Einteilung miteinbezieht [10]. Daneben existiert die auf der Expression verschiedener Marker basierende Klassifikation akuter Leukämien von der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) [11].

Aufgrund des sehr unterschiedlichen Diagnosespektrums wird generell zwischen Kindern und Erwachsenen unterschieden. Im Durchschnitt werden in Deutschland ca. 1.800 kindliche Krebserkrankungen neu diagnostiziert, von denen die Leukämien mit 33,8 % den größten Anteil ausmachen. Etwa 50 % der kindlichen Leukämien werden bereits vor dem Schulalter diagnostiziert. Während das Erkrankungsrisiko bei Kindern und jungen Erwachsenen mit zunehmendem Alter sinkt, steigt das Risiko ab dem 30. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Bei Erwachsenen kommen akute und überwiegend chronische Leukämien vor, wobei akute Formen eine wesentlich schlechtere Prognose haben als chronische Fälle. Konträr dazu werden im Kindesalter praktisch keine chronischen Leukämien diagnostiziert. Von allen Krebsdiagnosen im Kindesalter ist die ALL mit 26,3 % die häufigste Form [3] [4] [12].

## **2.2 URSACHEN UND GENETISCHE GRUNDLAGEN VON LEUKÄMIEN**

Für die Entstehung von Leukämien werden einige Hypothesen diskutiert, darunter der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil, Umwelteinflüssen, Viren, ungenügend ausgebildetem Immunsystem im Kindesalter, genetischen Veränderungen wie z. B. Trisomie 21 oder elektromagnetischen Emissionen. Als Risikofaktoren gelten vor allem ionisierende Strahlung, auch bei Strahlentherapie, Zytostatika bei Chemotherapie und verschiedene Chemikalien. Allerdings findet man bei den meisten Patienten keinen dieser Faktoren [3] [4], weshalb davon auszugehen ist, dass vermutlich vor der Geburt angelegte genetische Ereignisse wie Mutationen bestimm-

ter Gene Leukämien auslösen bzw. begünstigen [7]. Bereits Theodor Boveri postulierte 1914, dass Krebs aus Zellen mit irreparablen Gendefekten entsteht [13] [14]. Für die Leukämogenese sind zwei Mutationstypen entscheidend. Auf der einen Seite gibt es Klasse-I-Mutationen, die oft nur Punktmutationen zeigen und konstitutiv Proteine in Signalkaskaden aktivieren, wodurch ein Selektionsvorteil aufgrund von konstitutiver Zellzyklusstimulation und dadurch bedingter Proliferation entsteht. Andererseits existieren Klasse-II-Mutationen, vor allem chromosomale Translokationen, die Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von transkriptionellen Aktivator-Komplexen inaktivieren und damit die Differenzierung unterbinden [7] [15] [16].

Chromosomale Translokation bedeutet die Umlagerung von nichthomologen Chromosomenabschnitten [5]. Erhöht oder reduziert sich die Menge des Erbguts durch Duplikation oder Deletion, ist diese unbalanciert. Bleibt die Quantität der DNA-Menge unverändert, handelt es sich um eine balancierte, reziproke Translokation. Dies trifft auch auf Chromosomeninversionen zu.

Chromosomenaberrationen sind die Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen und anschließender fehlerhafter Reparatur besonders über den Mechanismus der nichthomologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ); ein Vorgang, der auch in frühen Phasen der B- und T-Zellentwicklung stattfindet. Die Bruchpunkte treten vor allem bei balancierten Translokationen bevorzugt in sogenannten *Breakpoint Cluster* Regionen (BCR), die überwiegend Introns von Genen repräsentieren [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23]. Chromosomale Translokationen betreffen meist für Transkriptionsfaktoren kodierende Gene. Die Konsequenz ist eine veränderte Transkription, wobei zwei Formen, Typ-I- und Typ-II-Translokationen unterschieden werden. Sind Gene für T-Zellrezeptoren oder Immunglobuline involviert, deren Rearrangement normalerweise bei der Entwicklung lymphatischer Zellen vorkommt, werden Protoonkogene aktiviert und die kodierten Proteine stark überexprimiert. Dieses Prinzip der ektopen Expression intakter Gene zeigt die Aktivierung des *c-Myc*-Gens im Fall der t(8;14)(q24;q23)-Translokation, welche in ca. 90 % der Patienten mit Burkitt-Lymphom vorliegt. Häufiger entstehen durch die Verknüpfung zweier Gene chimäre Fusionsgene mit intaktem Leseraster, aus denen Fusionsproteine mit neuen Funktionen gebildet werden. Das bekannteste Beispiel ist hier das Philadelphia-Chromosom, eine Fusion der beiden Gene für *BCR* und *c-ABL*, resultierend aus der t(9;22)(q34;q11)-Translokation [24] [25] [26], die primär für CMLs charakteristisch ist. Diagnosen dieses Leukämietyps zeigen in ca. 85 % die typische t(9;22)-

Translokation und weitere 5-10 % weisen Varianten davon auf, bei denen weitere Chromosomen involviert sind [27] [28]. Im Gegensatz dazu sind die genetischen Ursachen von CLLs heterogen und die Häufigkeit sowie die Bedeutung chromosomaler Translokationen ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Primär sind Deletionen, am häufigsten *del(13q14)*, relevant [29] [30]. Die genetischen Ursachen chronischer Leukämien zeigen, dass distinkte chromosomale Aberrationen bevorzugt bei einer Leukämieform und rekurrent auftreten. Korrelationen zwischen dem Krankheitstyp und der chromosomalen Veränderung kommen ebenfalls bei akuten Leukämien vor. Allerdings muss wegen markanter Differenzen der genetischen Subtypen zwischen adulten und kindlichen akuten Leukämien unterschieden werden. Die AML ist eine Erkrankung mit hoher genetischer Heterogenität. Bei pädiatrischen AMLs weisen ca. 20 % einen normalen Karyotyp auf, der häufig assoziiert ist mit Punktmutationen in vielen verschiedenen Genen, bevorzugt *FLT3*, *NPM1* und *CEBPA*. Daneben kommen chromosomale Translokationen wie z. B. *t(8;21)*, *t(15;17)* oder Rearrangements des *MLL*-Gens vor sowie Inversionen wie *inv(16)(p13q22)*, Deletionen oder Erhöhungen der Chromosomenzahl. Konträr dazu weisen adulte AML-Patienten in mehr als 50 % einen normalen Karyotyp auf, wobei diese oft Doppel- oder Dreifachmutationen vor allem in *FLT3*-, *NPM1*- und *CEBPA*-Genen tragen. Seltener als bei pädiatrischen AMLs findet man Translokationen [26] [31] [32] [33] [34] [35]. Pädiatrische ALLs zeigen zu ca. 25 % einen hyperdiploiden Karyotyp mit *Loss-of-function*-Mutationen in den Genen für *ETV6*, *CDKN2A*, *PAX3*, *PAN3* und *ARID5B* bzw. *Gain-of-function*-Mutationen vor allem in *RAS*-Genen. Weitere 25 % sind assoziiert mit der zum *ETV6-RUNX1*-Fusionsgen führenden *t(12;21)*-Translokation und mit ca. 8 % sind auch *MLL*-Rearrangements relativ häufig. Konträr dazu sind adulte ALLs mit ca. 7 % bzw. 2 % nur selten gekennzeichnet durch Hyperdiploidie oder *t(12;21)*-Translokationen. Am häufigsten findet man zu ca. 25 % die durch das *BCR-ABL*-Fusionsgen charakterisierte *t(9;22)*-Translokation. Ähnlich den pädiatrischen ALLs ist auch bei adulten ALLs das *MLL*-Gen in ca. 10 % involviert [26] [33] [36].

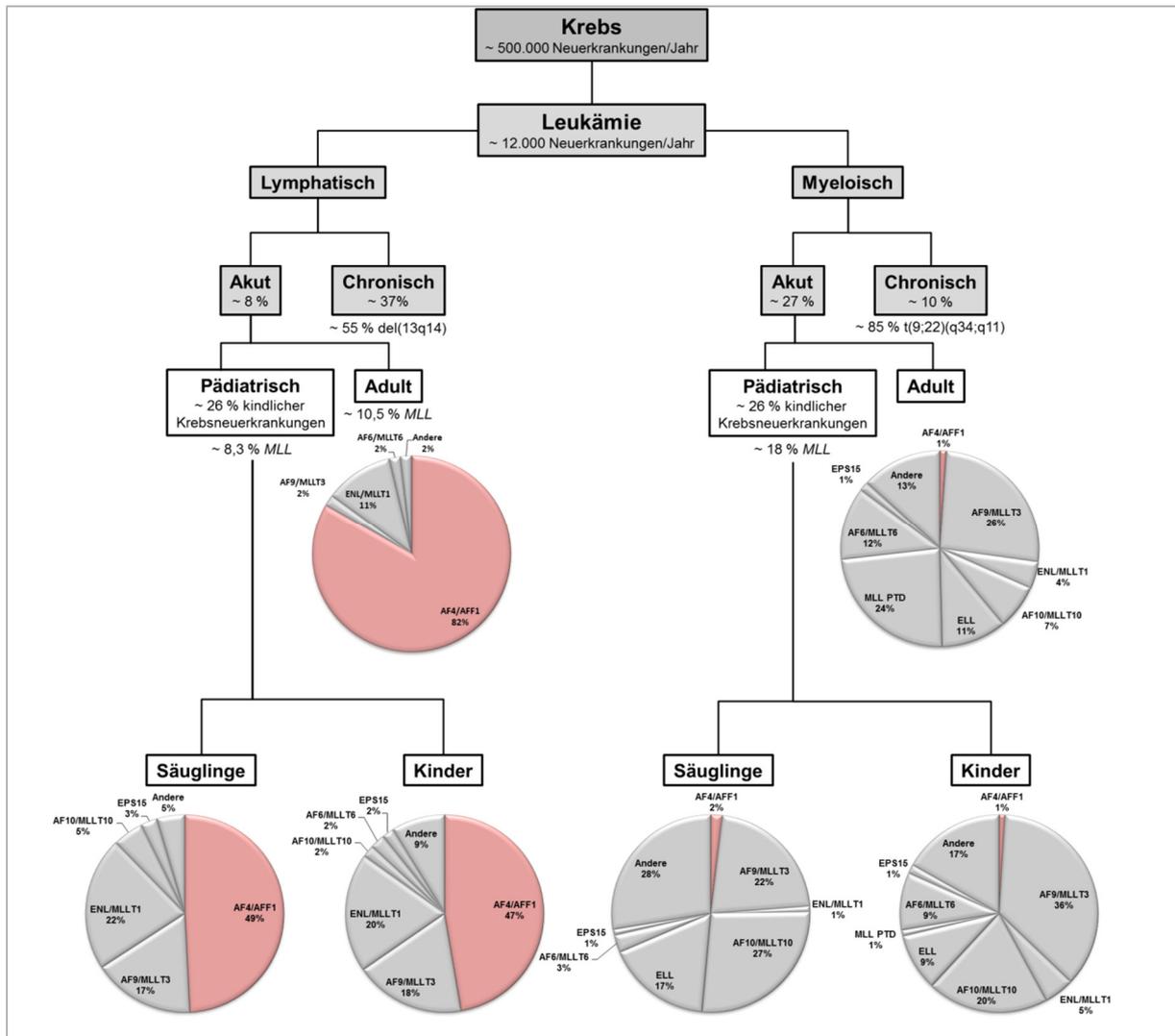
### 2.3 ABERRATIONEN DES *MLL*-GENS

Chromosomale Translokationen mit Beteiligung des *MLL*-Gens (vgl. Kapitel 2.4) werden bei etwa 10 % der *de novo* akuten Leukämien vermutet, obgleich ALLs häufiger resultieren als AMLs. Vielmals sind sekundäre Leukämien als Konsequenz einer Therapie mit beispielsweise Topoisomerase II-Inhibitoren involviert, wobei mehr als 90 % der therapieinduzierten und mit *MLL*-assoziierten Leukämien AML-Diagnosen darstellen (t-AML). Während die Heilungsraten vor allem kindlicher Leukämien insgesamt bei über 80 % liegen, ist das Auftreten von Aberrationen des *MLL*-Gens allgemein ein Faktor für eine schlechte Prognose, weshalb die Behandlung betroffener Patienten in ca. 90 % gemäß Hochrisikoprotokollen erfolgt. Die Heilungsraten variieren stark zwischen 11 % und 92 % in Abhängigkeit vom Translokationspartner des *MLL*-Gens und vom Alter des Patienten. Am häufigsten werden Aberrationen des *MLL*-Gens bei Patienten mit den balancierten Translokationen t(4;11)(q21;q23), t(11;19)(q23;p13) und t(9;11)(p21-22;q23) gefunden. Besonders Säuglinge mit einer ALL oder AML zeigen zu etwa 75 % ein *MLL*-Rearrangement und haben eine wesentlich schlechtere Prognose als ältere Kinder und junge Erwachsene, wobei vor allem t(4;11)- und t(11;19)-Translokationen mit Therapieresistenz assoziiert sind [33] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44].

Generell entstehen Aberrationen des *MLL*-Gens nach DNA-Strangbrüchen durch Aktivierung des DNA-Reparaturmechanismus der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ), wobei der offene Leserahmen intakt bleibt. Finden zwei unabhängige DNA-Strangbrüche statt, entstehen primär reziproke chromosomale Translokationen, aber auch komplexe chromosomale Aberrationen, geninterne Duplikationen, Deletionen oder Inversionen auf Chromosom 11q, Insertionen des *MLL*-Gens in andere Chromosomen oder umgekehrt sowie transkriptionelle Spleißreaktionen [21] [42] [44] [45] [46]. Die DNA-Doppelstrangbrüche entstehen bevorzugt in der *MLL* BCR, einem Bereich von ca. 8,3 kb zwischen den Exons 8 und 14 [20]. Tatsache ist, dass die Bruchpunkte sowohl bei akuten Säuglingsleukämien als auch bei t-AMLs gehäuft am telomerischen Ende der *MLL* BCR vorwiegend in *MLL* Intron 11 auftreten. Ein solcher Bruchpunkt ist assoziiert mit dem Alter unter 6 Monaten (83%), weiblichem Geschlecht (70%) und der Diagnose ALL (55%). Bei männlichem Geschlecht und AML-Diagnosen ist die Verteilung der Bruchpunkte in *MLL* Intron 11 und Intron 9 annähernd gleich verteilt (Männer: 40% und 35%; AML: 40% und 40%). Bei Kindern im

Alter von 7 bis 12 Monaten liegt der Bruchpunkt überwiegend im *MLL* Intron 9 (64%). Konträr zu den Säuglingsleukämien und tAMLs liegen die Bruchpunkte bei adulten *de novo* Leukämien primär im centromerischen Bereich und bedeuten eine wesentlich bessere Prognose als bei Bruchpunkten in *MLL* Intron 11. Das Auftreten von *Alu*-Elementen in *MLL* Introns sowie Konsensussequenzen der Topoisomerase II, *scaffold attachment regions* (SAR) und DNase I hypersensitiven Stellen kombiniert mit kryptischer Promotoraktivität und der Bindung des Transkriptionsfaktors CTCF in der *MLL* BCR sind häufig assoziiert mit DNA-Doppelstrangbrüchen [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57]. Hierfür werden verschiedene Hypothesen diskutiert, vor allem der Einfluss DNA-schädigender Substanzen. Da t-AMLs mit *MLL*-Aberration primär aus vorigen Therapien mit natürlichen Topoisomerase II-Inhibitoren wie z. B. Etoposid resultieren [58], wird für die Genese von akuten Säuglingsleukämien der Einfluss von Topoisomerase II-Inhibitoren, u. a. diätetischen Bioflavonoiden, *in utero* vermutet [59] [60]. Des Weiteren scheint die Einnahme von oralen Kontrazeptiva kurz vor oder während der Schwangerschaft ebenso wie normale Estrogenspiegel während des zweiten Trimenons für DNA-Doppelstrangbrüche im *MLL*-Gen verantwortlich zu sein [61] [62].

Wegen der starken Beeinflussung von Prognose, Therapie und deren Erfolg durch die Art des *MLL*-Rearrangements ist die Identifikation der jeweiligen *MLL*-Aberration und der resultierenden chimären Derivatchromosomen von großer Bedeutung. Die Fusion des *MLL* N-Terminus mit dem C-Terminus des Translokationspartnergens (TPG) wird als Derivatchromosom 11 (*der11*) bezeichnet. Bis jetzt wurden über *Long distance inverse*-PCR 79 direkte TPGs inklusive ihrer spezifischen Bruchpunktsregionen identifiziert. Bei 7 weiteren war der 5'-Part des *MLL*-Gens nicht fusioniert, in 19 Fällen (komplexe *MLL*-Rearrangements) wurde kein *der11*-, aber das reziproke *MLL*-Fusionsgen gefunden und 35 Translokationen wurden zwar zytogenetisch, aber nicht auf molekularer Ebene charakterisiert. Daraus ergibt sich, dass bis jetzt insgesamt 121 verschiedene direkte sowie 182 reziproke TPGs identifiziert wurden. Die überwiegend vorkommenden TPGs sind *AFF1/AF4*, *MLLT3/AF9*, *MLLT1/ENL*, *MLLT10/AF10*, *ELL*, *MLLT4/AF6*, *EPS15/AF1P*, *MLLT6/AF17* und *SEPT6*. Da deren Häufigkeiten, dargestellt in Abbildung 2-1, in Abhängigkeit vom Leukämietyp und vom Alter stark variieren, muss einerseits zwischen ALL und AML und andererseits zwischen Säuglingen, Kindern und Erwachsenen unterschieden werden [42] [44].



**Abbildung 2-1: Inzidenz der häufigsten TPGs in MLL-Rearrangements**

Übersicht über die überwiegenden Leukämietypen ALL, CLL, AML und CML, wobei 18 % nicht genau zugeordnet werden können. Die Diagramme zeigen die prozentuale Häufigkeit der prädominant vorkommenden Translokationspartnergene (TPGs) in akuten Leukämien mit MLL-assoziierten Translokationen in Abhängigkeit vom Alter. Dabei sind Säuglinge kein Jahr alt, Kinder stellen die Gruppe der 1-18-Jährigen dar und als Erwachsene zählen über 18-Jährige. Die Abbildung wurde modifiziert nach [44] mit Daten von [1] [3] [4] [12] [33].

### 2.3.1 DIE TRANSLOKATION T(4;11)(Q21;Q23)

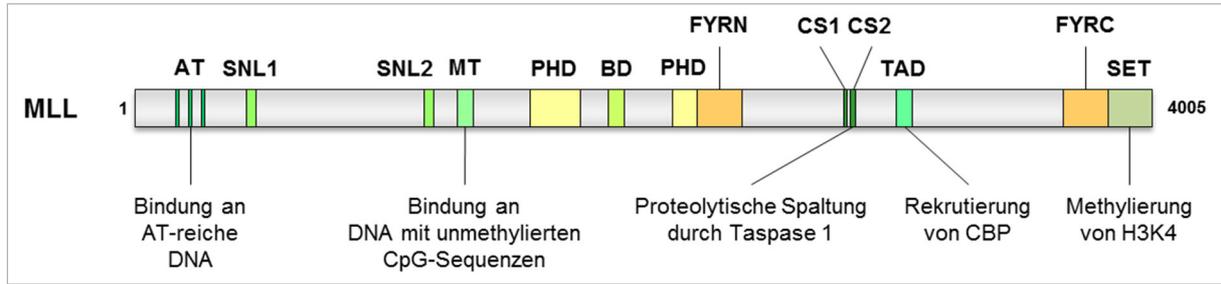
Das *AF4/AFF1*-Gen (vgl. Kapitel 2.5) auf Chromosomenbande 4q21 ist sowohl bei Säuglingen und Kindern als auch vor allem bei Erwachsenen das häufigste TPG in ALL, bei denen eine Translokation vorliegt, in die das *MLL*-Gen auf Chromosomenbande 11q23 involviert ist [42] [44] (vgl. Abbildung 2-1). Die daraus entstehende reziproke, unbalancierte Translokation t(4;11)(q21;q23) [23] resultiert in den beiden Fusionsgenen *MLL-AF4* und *AF4-MLL*. Unter allen bei ALLs vorkommenden chromosomalen Aberrationen ist die Inzidenz dieser mit ca. 50 % bei Säuglingen, die nur 2-3 % aller pädiatrischen ALLs ausmachen, am höchsten. Im Gegensatz dazu liegt die Inzidenz bei Kindern mit nur 2-3 % sehr niedrig und steigt bei Erwachsenen auf ca. 10 % [63] [64]. Den größten Peak mit über 50 % bilden die Säuglinge im Alter von weniger als 6 Monaten, während bei älteren Säuglingen nur 10-20 % betroffen sind [65]. Unter den t(4;11)-Patienten sind Frauen (63 %) häufiger als Männer (37 %) vertreten und überwiegend ALL-, sporadisch AML-Diagnosen [64] [66]. Neben *de novo* Leukämien sind sekundäre AMLs und seltener ALLs nach einer Therapie mit Topoisomerase II-Inhibitoren involviert [37]. Auch wenn die Hypothese weit verbreitet ist, dass das *MLL-AF4* für die Leukämogenese entscheidend ist, scheint das reziproke *AF4-MLL* vor allem in Bezug auf den Therapieerfolg eine wichtigere Rolle einzunehmen als erwartet [63] [67]. Allgemein haben Patienten mit t(4;11)(q21;q23)-Translokation eine extrem schlechte Prognose sowie eine hohe mit Therapieresistenz assoziierte Rückfallquote, weshalb die Therapie normalerweise gemäß Hochrisikoprotokollen erfolgt. Nach der Remissionsinduktionstherapie schließt sich eine intensive Postremissionschemotherapie bzw. teilweise allogene Stammzelltransplantation an, die nur gering die Überlebensraten verbessert. Des Weiteren kann eine ZNS-gerichtete Therapie durchgeführt werden. Wichtig ist auf jeden Fall eine zweijährige Erhaltungstherapie. Prognostische Faktoren zur Einteilung in Risikogruppen sind z. B. Alter, Geschlecht, Rasse, Immunphänotyp betroffener Zellen, Leukozytenzahl, Befall des zentralen Nervensystems, Splenomegalie, Hepatomegalie, Erfolg der Induktionstherapie sowie die minimale Resterkrankung (MRD) im Knochenmark. Oftmals ist eine Hyperleukozytose mit einer mittleren Leukozytenzahl von  $156,5 \times 10^9/l$  zu beobachten. Der Befall des zentralen Nervensystems wird bei Säuglingen signifikant häufiger beobachtet als bei Älteren. Die Leukämiezellen zeigen eine lymphoblastische Morphologie und exprimieren Stammzellmarker wie z. B. CD34 sowie B-Zellmarker wie z. B. CD19, während das *Common acute lymphocytic*

*leukemia antigen* (CALLA, CD10) meist fehlt. Allerdings sind typischerweise myeloische Marker wie z. B. CD15 präsent. Aufgrund dieser biphänotypischen Charakterisierung werden die meisten Fälle als pro-B-Zell-Leukämie klassifiziert. Der wichtigste prognostische Faktor scheint das Alter zu sein, da Kinder im Vergleich zu Säuglingen und Erwachsenen eine marginal bessere Prognose haben. Während bei 88 % der Kinder und 75 % der Erwachsenen vollständige Remission erreicht wird, liegt die mittlere Gesamtüberlebensrate bei nur 10 bzw. 7 Monaten. Besonders Säuglinge, die kein Jahr alt sind, zeigen im gesamten Vergleich eine signifikant ungünstigere Prognose, die bei schlechtem Ansprechen auf die Therapie enorm abnimmt. Die schlechteste Prognose haben Säuglinge im Alter von weniger als 3 Monaten. Dieses gehäufte Auftreten bei sehr jungen Säuglingen weist auf eine sehr kurze Latenzzeit hin, weshalb das Vorhandensein der relevanten genetischen Veränderungen vor der Geburt diskutiert wird und bereits nachgewiesen werden konnte [40] [63] [64] [65] [66] [68] [69] [70].

## 2.4 WILDTYPPROTEIN MLL

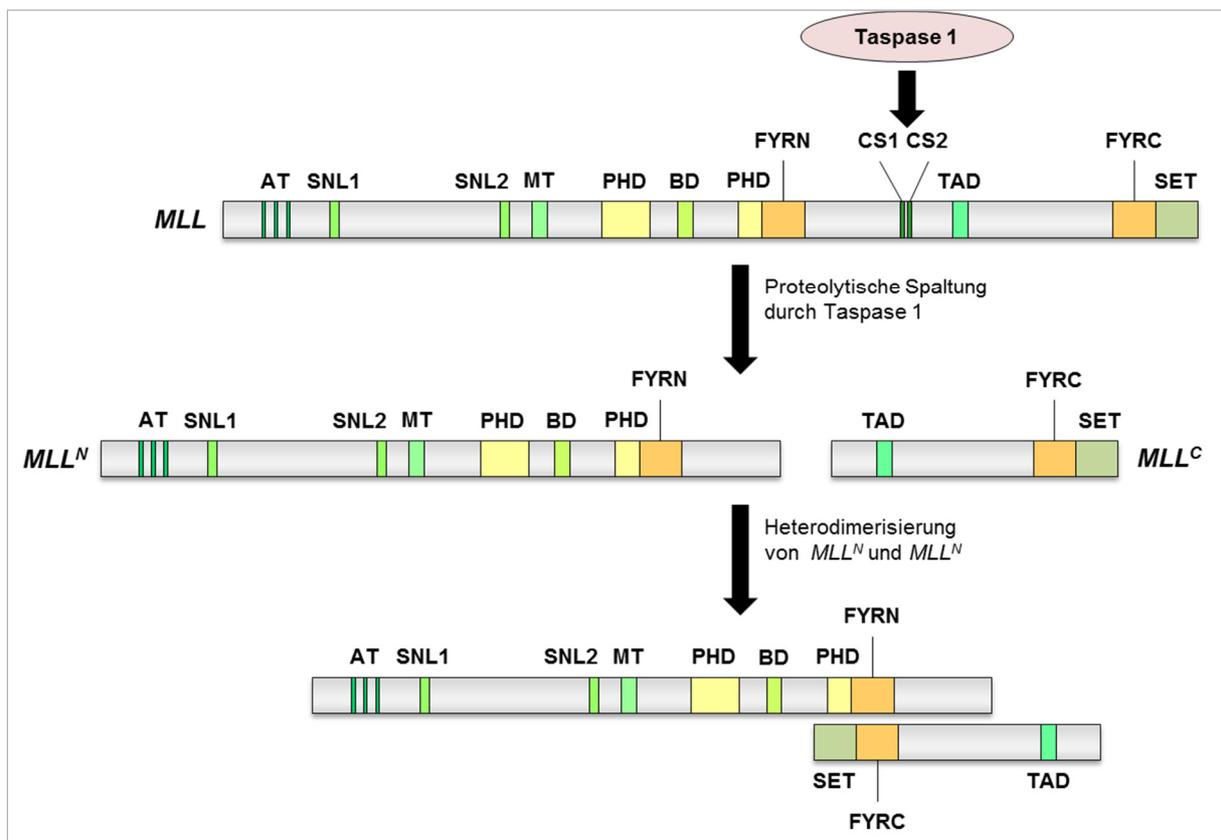
*KMT2A*, *Lysine (K)-specific methyltransferase 2A* [71], ist das offizielle Symbol des humanen *Mixed Lineage Leukemia (MLL)*-Gens [72]. Synonym verwendet werden u. a. die Abkürzungen *ALL-1* [73] [74], *Htrx1* [75], *HRX* [76], *MLL1A* und *TRX1* [71].

Das *MLL*-Gen ist in chromosomale Aberrationen involviert, welche mit therapieresistenten akuten Hochrisikoleukämien assoziiert sind, die bevorzugt im Säuglingsalter auftreten und eine extrem schlechte Prognose, hohe Rückfallquote und geringe Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen (vgl. Kapitel 2.3). Lokalisiert auf Chromosom 11q23 überspannt das *MLL*-Gen einen Bereich von ca. 92 kb [72] mit 37 Exons [47] und kodiert einen offenen Leserahmen von 12.018 bp sowie das daraus abgeleitete *MLL*-Protein mit 4005 AS und einem Molekulargewicht von ca. 435 kDa [77]. Aufgrund eines alternativen Spleißprozesses ist das zu ca. 90 % am häufigsten vorkommende mRNA-Transkript durch das Fehlen des Exons 2 charakterisiert [20] [47] [78] und kodiert für ein Protein mit 3972 AS [74] [76]. Weitere alternative Spleißprozesse sowie der Gebrauch unterschiedlicher Exons existieren und werden im Folgenden in Kapitel 2.4.2 näher erläutert.



**Abbildung 2-2: Das MLL-Protein**

Die Abbildung 2-2 zeigt das MLL-Protein mit seinen charakteristischen funktionellen Domänen sowie deren Aktivität in schematischer Darstellung. Die angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl an AS.



**Abbildung 2-3: Proteolytische Spaltung des MLL-Proteins**

Die Abbildung 2-3 veranschaulicht die proteolytische Spaltung des MLL-Proteins durch die Threonin-Aspartase Taspase 1 sowie die anschließende stabilisierende Heterodimerisierung der beiden gebildeten Fragmente MLL<sup>N</sup> (p300) und MLL<sup>C</sup> (p180) in schematischer Darstellung.

AT: AT-hooks; SNL1 und SNL2: *Speckled nuclear localization*; MT: Methyltransferase-Domäne; PHD: *Plant Homeodomain*; BD: Bromodomäne; FYRN und FYRC: Heterodimerisierungsdomänen; CS1 und CS2: Erkennungssequenzen für proteolytische Spaltung durch Taspase 1; TAD: Transaktivierungsdomäne; SET: *Suppressor of variegation (Su(var)3-9)*, *Enhancer of zeste*, and *Trithorax* (SET)-Domäne.

Charakteristisch für das MLL-Protein sind folgende distinkte funktionelle Domänen: Drei N-terminale *AT-hooks* binden ebenso wie die beiden flankierenden „SPKK“-Konsensussequenzen in der kleinen Furche AT-reicher DNA [76]. Zwei kurze Kernlokalisierungssequenzen, SNL-1 und SNL-2, sind für die punktuelle subnukleäre Distribution des MLL-Proteins verantwortlich [79]. Die Methyltransferase (MT)-Domäne erkennt DNA mit unmethylierten CpG-Sequenzen [80] und besitzt repressive Aktivität [81] durch die Interaktion mit den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 einerseits sowie mit dem *C-terminal binding protein* (CtBP) und den *Polycomb Group* (PcG)-Proteinen HPC2 und BMI-1 andererseits, die als Korepressoren fungieren [82]. Die vier in der großen DNA-Furche bindenden *Plant Homeodomain* (PHD)-Finger werden in Kapitel 2.4.1 detaillierter beschrieben. Unterbrochen wird diese Region zwischen PHD3 und PHD4 von der Bromodomäne (BD), welche die PHD3-Bindung an Histon 3-Lysin 4-Methylierungen (H3K4<sub>me</sub>-Signaturen) verstärkt [83] und mit dem elongierten PHD4 über die Bindung von ASB2 die Degradierung des MLL-Proteins bewirkt [84]. An den zwei konservierten Erkennungssequenzen CS1 und CS2 wird das MLL-Protein im Zytoplasma durch die Threonin-Aspartase Taspase 1 proteolytisch gespalten. Die beiden entstehenden Fragmente MLL<sup>N</sup> (p300) und MLL<sup>C</sup> (p180) translozieren in den Nukleus und bilden einen stabilen Komplex durch Heterodimerisierung über Interaktion ihrer FYRN- und FYRC-Domänen (vgl. Abbildung 2-3) [85] [86] [87] [88]. Ohne diese Stabilisierung werden MLL<sup>N</sup> und MLL<sup>C</sup> proteasomal degradiert [89]. Wenn die intramolekulare Interaktion fehlt, verliert das MLL-Protein seine Funktion, während eine nicht stattfindende Prozessierung des MLL-Proteins zu keinen funktionellen Veränderungen führt [90]. Die Transaktivierungsdomäne (TAD) rekrutiert das *CREB Binding Protein* (CBP) zur Transkriptionsaktivierung durch Histonacetylierung [81] [91] und die C-terminale *Suppressor of variegation* (*Su(var)3-9*), *Enhancer of zeste*, and *Trithorax* (SET)-Domäne methyliert Lysin 4 (K4)-Reste von Histon H3 bevorzugt bei acetyliertem H3 und nur bei unmethyliertem K4 erfolgt [92] [93].

Das zum *Drosophila melanogaster trithorax*-Gen (*trx*) orthologe [74] [75] [76] [94] und in weiteren 87 Organismen konservierte [71] *MLL*-Gen wird nahezu ubiquitär transkribiert, jedoch variieren die MLL-Expressionslevel gewebespezifisch, möglicherweise auch aufgrund der relativen Instabilität des MLL-Proteins [73] [76] [94] [95]. Aufgrund der vergleichbaren Größe sowohl der Transkripte von *MLL* und *trx* als auch der beiden resultierenden Proteine, besonders aber wegen der Similarität im

C-Terminus sowie bei zwei konservierten cystein- und histidinreichen PHD-Zinkfinger-Domänen [74] [75] [76] wird MLL in die Gruppe der *Trithorax* (TrxG)-Proteine eingeordnet. Diese sind ebenso wie die PcG-Proteine, ihre antagonistischen Gegenspieler, hoch konserviert und an der epigenetischen Regulation beteiligt, weshalb sie für die korrekte Entwicklung und die Erhaltung eines Differenzierungsstatus essentiell sind. Am besten charakterisierte Targetgene der TrxG- und PcG-Proteine sind die für Transkriptionsfaktoren kodierenden *homeobox* (*HOX*)-Gene [96], welche in zahlreiche Prozesse während der Embryogenese wie die Ausbildung der Körperlängsachse oder die Hämatopoese involviert sind [97]. Die Regulation der MLL-abhängigen *HOX*-Gene wie z. B. *HOXA9* oder *HOXC8* durch MLL erfolgt über die direkte Bindung an Sequenzen in der Promotorregion [92]. Wie bedeutend MLL als *HOX*-genregulierendes TrxG-Protein ist, zeigt der homozygote *Mll*<sup>-/-</sup>-Knockout mit dem Verlust der *HOX*-Genexpression nach initialer normaler *HOX*-Genaktivierung und embryonaler Letalität als Folge [98]. Offensichtlich ist nicht nur die Initiierung der *HOX*-Genexpression entscheidend, sondern vielmehr deren Aufrechterhaltung [99]. Darüber hinaus führt *Mll*-Defizienz zu fehlerhafter Hämatopoese sowie zur Reduktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen [100] [101] [102]. Das MLL-Protein ist Teil eines großen, stabilen Multiproteinkomplexes (MPC), welcher die konservierten und für seine volle Aktivität essentiellen Proteine RbBP5, ASH2L und WDR5 beinhaltet und sich an der MLL SET-Domäne formiert, durch die spezifisch H3K4-Reste methyliert werden [93] [103] [104] [105]. Solche H3K4<sub>me</sub>-Signaturen sind assoziiert mit transkriptionell aktivem Chromatin [106]. Über die Interaktion mit den Histoneacetyltransferasen MOF [107] und CBP [91] agiert der MLL-MPC zusätzlich als Koaktivator. Weitere partiell konservierte Komponenten des Komplexes sind die Zellproliferationsfaktoren HCF1 bzw. HCF2 [108] und der Tumorsuppressor Menin [109] [110]. Andere Chromatinmodifikationen wie z. B. Methylierungen an H3K9 oder H3K27 führen zu transkriptioneller Repression. Sie stammen von PcG-Proteinen, die sich in *Polycomb repressive complexes* (PRC) formieren, wobei die beiden Komplexe PRC1 (*Polycomb maintenance complex*) und PRC2 (*Polycomb initiator complex*) bisher am besten untersucht sind [96] [106] [111]. Diese Prozesse der transkriptionellen Repression durch PcG-Proteine und der Aktivierung durch TrX-Proteine zeigen die antagonistische Beteiligung beider Proteingruppen an der epigenetischen Regulation in dynamischer Balance [96] [112]. Oft, besonders in Stammzellen, kommen aktive und passive Signaturen benachbart vor, sodass solche Domänen als bivalent

---

charakterisiert werden und das schnelle An- und Abschalten von Genen ermöglichen [112] [113].

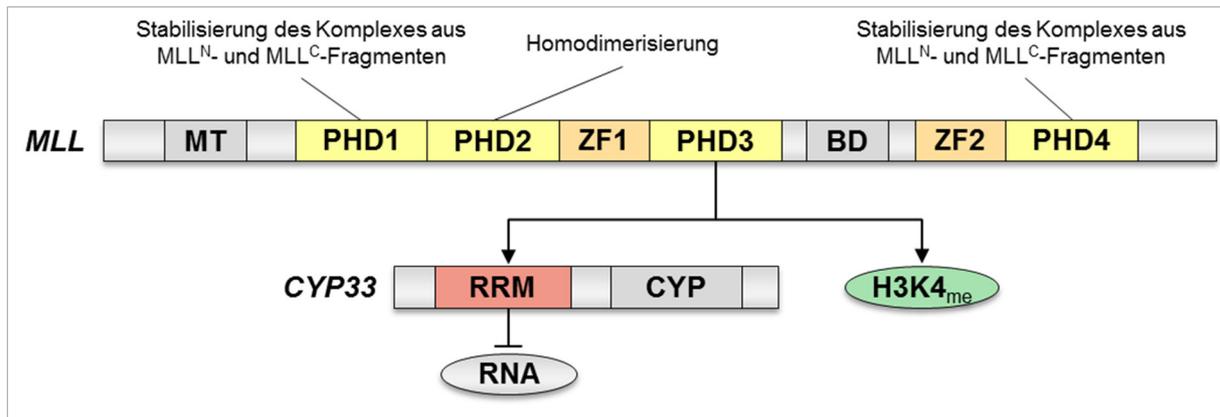
#### 2.4.1 PHD-FINGER DES MLL-PROTEINS

*Plant Homeodomain* (PHD)-Finger sind strukturell konservierte Domänen, welche erstmals in einem *Homeodomain* Protein von *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurden und in vielen eukaryotischen nukleären Proteinen vorkommen. Sie bestehen aus ca. 60 AS und zeigen typischerweise eine Cys<sub>4</sub>-His-Cys<sub>3</sub>-Struktur mit charakteristischem Abstand zwischen den Cysteinen (C-X<sub>2</sub>-C) und weiteren konservierten Sequenzen, wobei als Zn<sup>2+</sup>-Bindedomäne hier zwei Zinkionen koordiniert werden. Diese Struktur zeigt große Ähnlichkeit zur *Really Interesting New Gene* (RING) *finger domain*, die eine Cys<sub>3</sub>-His-Cys<sub>4</sub>-Signatur aufweist und als E3-Ligase an der Ubiquitylierung beteiligt ist. Aufgrund von kleinen Unterschieden in den Ligandbindestellen verschiedener PHD-Proteine zeigt sich funktionale Diversität. Alle sind entweder direkt in die Modifizierung von Chromatin involviert oder indirekt über die Funktion als Domäne für Proteininteraktionen [114] [115] [116] [117] [118] [119].

Die Aminosäuresequenz des MLL-Proteins prognostiziert vier PHD-Motive (vgl. Abbildung 2-4). Flankiert von einer MT-Domäne folgt den ersten beiden PHD-Fingern (PHD1 und PHD2) ein einzelner C<sub>4</sub>-Typ-Zinkfinger (ZF1) vor dem PHD3. Die drei konsekutiven PHD-Finger (PHD1-3) sind durch eine Bromodomäne (BD) sowie einen weiteren Zinkfinger (ZF2) vom PHD4 separiert. Alternativ werden ZF1 und PHD3 ebenso wie ZF2 und PHD4 als elongierte PHD-Finger (ePHD3 bzw. ePHD4) bezeichnet [120] [121] [122]. Diese Anordnung der PHD-Fingerkassette ist nicht nur in *Drosophila melanogaster trithorax*-Proteinen konserviert, sondern auch im Maus- und Kugelfisch-Mll-Protein ebenso wie im humanen MLL4-Protein (ursprünglich als MLL2 bezeichnet). In der MLL-Subfamilie kommen PHD-Domänen weiterhin in den Proteinen MLL2 (ursprünglich MLL4 bezeichnet), MLL3 und MLL5 hingegen in anderer Anordnung und differenter Anzahl vor [120] [122] [84].

Jeder MLL PHD-Finger ist charakteristisch, aber gemeinsam ist die regulatorische Aktivität bei Funktionen des MLL-Proteins [120] [123]. Als Teil des MLL<sup>N</sup>-Fragments stabilisieren PHD1 und PHD4 gemeinsam mit der MLL<sup>N</sup>-FYRN-Domäne den Komplex aus den beiden MLL<sup>N</sup>- und MLL<sup>C</sup>-Fragmenten durch intramolekulare Interaktion [89]. Der PHD2-Finger ist für die Homodimerisierung der MLL PHD-Kassette verantwortlich [120] und zeigt E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität in Gegenwart des

E2-konjugierenden Enzyms CDC34. Neben den Histonen H3 und H4 wird dabei MLL selbst ubiquitinyliert, wodurch dessen Degradation während des Zellzyklus reguliert wird [84]. Aufgrund der im Gegensatz zur RING-Fingerdomäne fehlenden Interaktionsdomäne für die Aktivität als E3-Ubiquitin-Ligase scheint hier die ähnliche Aktivität als *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) E3-Ligase wahrscheinlicher [118]. Für die ePHD-Finger wurde Homooligomerisation beobachtet, aber auch die Unfähigkeit, klassische PHD-Finger zu binden [124]. Strukturell und funktionell bis jetzt am besten charakterisiert ist der PHD3 [122], der essentiell ist für die stabile MLL Bindung an Targetgene und als regulatorische Plattform für die Kontrolle der transkriptionellen Regulation durch MLL dient. Einerseits erkennt der PHD3 H3K4<sub>me</sub>-Signaturen, Produkte der enzymatischen MLL-Aktivität. Die spezifische Bindung ist bedingt durch ein unveränderliches Tryptophan, welches für die Erkennung methylierter Lysinreste von kritischer Bedeutung ist. Diese Bindung wird verstärkt von der durch einen 8 AS-Linker separierten BD. Während die Bindungsaffinität für trimethylierte H3K4-Peptide im niedrigen  $\mu\text{M}$ -Bereich am größten ist, findet die Interaktion ebenso bei Di- und Monomethylierungen statt, aber viel schwächer [83] [125] [126]. Alternativ zu H3K4<sub>me</sub>-Signaturen wird spezifisch das nukleäre Cyclophilin 33 (CYP33, syn. PPIE) gebunden, eine Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase mit N-terminaler RNA-Erkennungsdomäne (RRM, *RNA recognition motif*) und konservierter C-terminaler Peptidylprolyl-Isomerase (PPIase)-Domäne, auch Cyclophilin-Domäne genannt. Die RRM-Domäne besitzt partiell überlappende Bindestellen für RNA und den PHD3, zu dem die Affinität wesentlich höher ist. Deshalb wird die Assoziation der RRM-Domäne mit RNA durch die Interaktion mit dem PHD3 verhindert. Aufgrund der durch CYP33 verursachten Konformationsänderung im Linker zwischen PHD3 und BD von *cis* zu *trans* wird die Bindung der beiden Domänen gestört. Durch die frei werdende RRM-Bindestelle im PHD3 kann CYP33 besser an diesen binden. Die PHD3-Bindestellen für die CYP33 RRM-Domäne und H3K4<sub>me</sub>-Signaturen liegen benachbart, überlappen aber nicht [82] [83] [120] [122] [126] [127] [128].



**Abbildung 2-4: PHD-Finger des MLL-Proteins**

Die Abbildung 2-4 zeigt die PHD-Finger des MLL-Proteins und ihre jeweiligen Funktionen in schematischer Darstellung. Die drei konsekutiven PHD-Finger (PHD1-3) werden flankiert von einer strangaufwärts gelegenen MT-Domäne und unterbrochen von einem normalen Zinkfinger (ZF1). Nach einer Bromodomäne (BD) folgt ein weiterer einzelner Zinkfinger (ZF2) sowie der PHD4. Der ZF1 zusammen mit PHD3 bzw. der ZF2 mit PHD4 werden als elongierte PHD-Finger ePHD3 bzw. ePHD4 bezeichnet. Die Abbildung wurde modifiziert nach [121] [122]. Jeder MLL PHD-Finger zeigt regulatorische Aktivität bei den Funktionen des MLL-Proteins. PHD1 und PHD4 sind an der intramolekularen Stabilisierung des Komplexes aus MLL<sup>N</sup>- und MLL<sup>C</sup>-Fragmenten beteiligt [89]. Der PHD2 kann homodimerisieren [120] und ist als E3-Ubiquitin-Ligase aktiv [84]. Am besten charakterisiert ist der PHD3, der entweder H3K4<sub>me</sub>-Signaturen erkennt oder an CYP33 bindet [122] [120] [83] [125] [127] [82] [128].

#### 2.4.2 ALTERNATIVE SPLEIßVARIANTEN DES *MLL*-GENS

Alternatives Spleißen stellt einen wichtigen Prozess der posttranskriptionellen Genregulation in Eukaryoten dar, bei dem aus einer DNA-Sequenz und somit aus einer prä-mRNA unterschiedliche mRNA-Transkripte und daraus differente Proteine mit potentiellen distinkten Funktionen gebildet werden. Dieser Prozess ist sowohl bei *Drosophila melanogaster* und humanen *HOX*-Genen als auch bei dem *HOX*-genregulierenden *trx*-Gen bzw. dem humanen *MLL*-Gen verbreitet [129] [130]. Bei Letzterem umfasst das alternative Spleißen neben dem vollständigen oder partiellen Überspringen (*exon skipping*) auch die „Verwürfelung“ von Exons (*exon scrambling*) [131] [132]. Die funktionelle Signifikanz des *exon scrambling*, bei dem die Exons richtig gespleißt aber falsch verknüpft werden, ist unklar, da dieser Prozess sowohl bei malignen als auch normalen Geweben verbreitet ist [132].

Für das *MLL*-Gen wurde die erste alternativ gespleißte mRNA identifiziert durch die Präsenz oder Abwesenheit von 9 Nukleotiden bzw. einem Tripeptid (GTE) am Übergang von Exon 15 zu Exon 16 aufgrund einer alternativen Spleißdonorstelle, wodurch die Struktur des PHD3 modifiziert wird. Während die –GTE-Variante sowohl in Säugern als auch in *Drosophila melanogaster* konserviert ist, gilt dies für die

+GTE-Form nur für Säugetiere [94] [133]. Zusätzlich gibt es einen alternativen Spleißprozess an der Exon 15-Exon 16-Verknüpfung, durch den die ersten 11 Aminosäuren von *MLL* Exon 16 eliminiert werden [78]. Bei einer weiteren Variante fehlt das innerhalb der *MLL* BCR liegende Exon 11 mit 114 Nukleotiden und bedingt eine Verkürzung des PHD1, weshalb eine strukturelle Veränderung der gesamten PHD1-3-Domäne ermöglicht wird. Allerdings scheint das Vorhandensein des Exons 11 kombiniert mit der Absenz der 9 Nukleotide an der Exon 15/16-Verknüpfung die prädominant vorkommende mRNA in hämatopoetischen Zelllinien zu sein. Ein ähnlicher alternativer Spleißprozess ist bekannt beim *Wilms tumor susceptibility gene* (WT1). Dieses kodiert für ein Protein mit Zinkfingern, welche an der Regulation von Wachstum und Differenzierung normaler und kanzerogener Zellen beteiligt sind. Die Abwesenheit dieses Gens bei Nephroblastoma ist assoziiert mit dem veränderten Phänotyp der Krebszellen [94] [130]. Unterdessen wurden beim *MLL*-Gen unvollständig prozessierte Transkripte identifiziert, bei denen Introns präsent sind [94]. Gezielte Untersuchungen zum alternativen Spleißen des *MLL*-Gens identifizierten weiterhin die variablen *MLL*-Exons 2, 4, 9 und 28 [130]. Vor allem Exon 2 wird mit nur ca. 10 % sehr selten genutzt [77] [78] [130]. Für Exon 4 gibt es zwei partielle Spleißvarianten, bei denen entweder die Basen 1-2517 oder 325-2517 von Exon 4 fehlen. Damit werden entweder alle drei *AT-hooks* oder ein *AT-hook* eliminiert. Diese Domänen weisen eine signifikante Homologie zu den erstmals in HMG-I/Y-Proteinen, Produkte eines alternativen Spleißprozesses, beobachteten *AT-hook*-Motiven auf. Für die Variante mit zwei *AT-hooks* könnte bedeutend sein, dass bei den HMG-I/Y-Proteinen die ersten beiden *AT-hooks* relevant sind für deren Bindung an DNA. Da das *trx*-Gen keine dieser Domänen aufweist, ist möglicherweise auch die Funktion der *MLL*-Form ohne *AT-hooks* interessant [77] [130]. Alternatives Spleißen der *MLL*-Exons 9 (selten) bzw. 28 (häufig) führt zu Fehlern im offenen Leserahmen der mRNAs mit strangabwärts liegenden Stop-Codons und beeinflusst entweder die Repressions- oder die Aktivierungsdomäne [130]. Letztendlich werden zwei weitere alternative *MLL*-Transkripte gebildet. Während ein Transkript aufgrund eines geninternen Promotors *MLL* Exon 12 bis 37 überspannt und für das am N-Terminus verkürzte *MLL*\*-Protein kodiert [54], ist für das andere *MLL* Transkript eine frühzeitige Termination in *MLL* Intron 8 und 9 möglich wegen vorhandener kryptischer Poly(A)-Stellen [134].

## 2.5 WILDTYPPROTEIN AF4

Das humane auf Chromosom 4q21 lokalisierte *ALL-1 fused gene from chromosome 4* (AF4) kodiert für das auch FEL (*Four Eleven Leukemia*) genannte AF4-Protein [74] [77] [135] [136] [137]. Als offizielles Symbol wird *AFF1 (AF4/FMR2 family member, 1)* genutzt, während früher die Symbole MLLT2 oder PBM1 verwendet wurden [71]. Als *MLL* TPG ist es an der t(4;11)(q21;23)-Translokation beteiligt (vgl. Kapitel 2.3.1). Der vom *AF4*-Gen überspannte Bereich beträgt ca. 300 kb und umfasst 20 Exons. Das 10,5 kb lange mRNA-Transkript kodiert das aus 1.218 AS bzw. 1.211 AS bestehende AF4-Protein mit einem Molekulargewicht von 131 kDa, das aus noch nicht geklärten Gründen bei 171 kDa apparent ist [138]. Durch den alternativen Gebrauch der ersten Exons 1a (12 AS) und 1b (5 AS) entstehen die beiden mit gleicher Häufigkeit auftretenden Proteine FelA und FelB [135] [136] [138]. Außerdem kann aufgrund einer kryptischen Polyadenylierungsstelle im Intron 3 das Transkript bereits frühzeitig nach 2,8 kb terminiert werden, wodurch das seltener vorkommende FelC-Protein gebildet wird [138]. Ähnlich wie beim *MLL* treten DNA-Doppelstrangbrüche gehäuft an einer genomischen Region auf, die mit 38 kb jedoch wesentlich größer ist und von Exon 3 bis Exon 6 reicht [22] [137] [138]. Bevorzugt entstehen chromosomale Bruchpunkte in Intronbereichen der *AF4* BCR, besonders in Intron 3 und 4, seltener in Intron 5, die wie die Introns der *MLL* BCR alle Typ 0-Introns darstellen (Unterbrechung zwischen zwei Triplets) [137] [138] [139] [140] [141]. Weitere Analogien zum *MLL* sind die ubiquitäre Expression sowie die nukleäre Lokalisation des AF4-Proteins [135] [137] [138] [142] [143]. Wegen vergleichbarer Proteinsequenz und -größe wird das AF4-Protein in die Familie der ALF-Proteine eingeordnet [138], zu der neben den beiden Proteinen LAF4 [144] und FMR2 [145] [146] auch das später zugeordnete Produkt des *AF5q31*-Gens zählen [147] [148]. Abgesehen von FMR2, das für das Nervensystem relevant und dessen Fehlen mit mentaler Retardierung assoziiert ist [145] [146], sind sowohl *AF4* als auch *LAF4* und *AF5q31* in *MLL*-Translokationen involviert [144] [148] [149] [150]. Des Weiteren wurden für LAF4 und FMR2 Transkripte beobachtet, deren Produkte dem FelC-Protein ähneln [144] [151]. Charakteristisch für die ALF-Proteine sind fünf konservierte Domänen: Die N-terminale Homologiedomäne (NHD), die familienspezifische ALF-Domäne (*AF4*/*LAF4*/*FMR2*), eine serinreiche Domäne (pSer), zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) sowie die C-terminale Homologiedomäne (CHD) (vgl. Abbildung 2-5) [138]. Wegen des analogen C-terminalen Bereichs mit pSer, NLS und

CHD ist das *Drosophila melanogaster lilliputian*-Gen (*Lilli*) das bisher einzige identifizierte zum *AF4* orthologe Gen in *Invertebrata*, welches am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung beteiligt ist. Insgesamt betrachtet zeigt das *Lilli*-Gen mit den N-terminalen glutaminreichen Bereichen, dem *AT-hook* und dem zur potentiell transaktivierenden *Pit-1*, *Oct-1/Oct-2*, *Unc-68* (POU)-Domäne von Klasse III-Transkriptionsfaktoren homologen Motiv eine größere Ähnlichkeit zum chimären *der11* (vgl. Kapitel 2.6.1) [152] [153]. Auch wenn die Funktionen der einzelnen Domänen der ALF-Proteine bisher weitgehend ungeklärt sind, kann sowohl dem *AF4* als auch dem *LAF4* eine mögliche Rolle als Transkriptionsfaktor zugeschrieben werden aufgrund ihres DNA-bindenden und transkriptionell aktivierenden Potentials, wobei die pSer-Domäne die transaktivierende Funktion übernimmt [144] [154] [155]. Obwohl *FMR2* keine DNA-bindende Domäne aufweist, scheint auch hier eine Funktion als transkriptioneller Aktivator wahrscheinlich [156]. Für die ALF-Domäne wird eine Funktion als transkriptioneller Repressor diskutiert [156]. Abgesehen von *AF4* zeigen alle ALF-Proteine die gleiche subnukleäre Lokalisation, wo sie RNA binden können und ihre Beteiligung an alternativen Spleißprozessen nachgewiesen wurde [157]. Untersuchungen muriner *AF4*-Expressionsmuster während der Entwicklung suggerieren die Beteiligung an der Entwicklung des hämatopoetischen, kardiovaskulären, skeletalen und zentralnervösen Systems [158]. Die Relevanz von *AF4* bei der Hämatopoese zeigt ein murines *AF4-knock out*-Modell mit Defekten in der B- und T-Zellentwicklung [159]. Ein weiteres Mausexperiment, bei dem die Expression eines in der ALF-Domäne mutierten *AF4* zum Verlust von Purkinjezellen im Cerebellum führt und die „*robotic mouse*“ mit eingeschränkten motorischen Funktionen zur Folge hat, demonstriert die Wichtigkeit für das Nervensystem [160].



#### Abbildung 2-5: Das AF4-Protein

Die Abbildung 2-5 zeigt das AF4-Protein mit seinen charakteristischen funktionellen Domänen in schematischer Darstellung. Die angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl an AS.

NHD: N-terminale Homologiedomäne; ALF: *AF4/LAF4/FMR2*-Domäne; pSer: Serinreiche Domäne; NLS: Kernlokalisationssequenz; CHD: C-terminale Homologiedomäne.

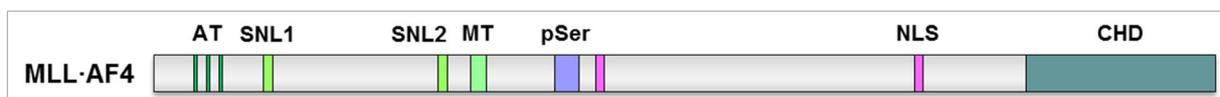
Diese Mutation befindet sich an einer Stelle der ALF-Domäne, die eine AF4-Bindestelle für die E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 darstellt und reduziert die AF4-Bindung zu SIAH1, wodurch es zu einer AF4-Akkumulation kommt. Normalerweise wird das AF4-Expressionslevel durch SIAH1 reguliert und bedingt die proteasomale Degradierung des AF4-Proteins. Die Überexpression von AF4 zeigt onkogene Eigenschaften und führt zu Wachstumstransformation [161] [162]. Durch die Interaktion mit AF9, ENL und AF10, deren kodierende Gene ebenfalls häufige *MLL* TPGs darstellen, ist das AF4-Protein Teil des transkriptionell regulatorischen und chromatinmodulierenden Multiproteinkomplexes AEP, der aus weiteren transkriptionsregulatorischen Proteinkomponenten besteht. Die positive Regulation der Gentranskription durch Stimulierung der P-TEFb-Pol II-Kinaseaktivität und die DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung, auch in der *robotic mouse* beobachtete Prozesse, bewirken die Transition der in der Promotorregion arretierten RNA-Polymerase II (Pol O) in den Status der produktiven Elongation (Pol E) [163] [164] [165] [166] [167] [168]. Neben der Pol II-Phosphorylierung wird auch AF4 selbst als Substrat von P-TEFb phosphoryliert und bedingt die negative Regulation seiner transaktivierenden Aktivität [165]. Weiterhin ist AF4 ein ubiquitärer Bestandteil von P-TEFb-Komplexen und ermöglicht die Tat-abhängige P-TEFb-Freisetzung aus 7SK snRNP sowie die Bildung von Tat-SECs für die HIV-Transkription [169]. Außerdem reguliert AF4 die Transkription von CD133, das die Anreicherung von Stammzell- und Krebsstammzellpopulationen ermöglicht und für das Überleben von Zellen essentiell scheint [170].

## **2.6 FUSIONSPROTEINE *MLL*·*AF4* UND *AF4*·*MLL***

Die t(4;11)-Translokation resultiert, ausgehend vom *MLL*-Gen auf Chromosom 11q23 einerseits und dem *AF4*-Gen auf Chromosom 4q21 auf der anderen Seite, in zwei reziproken Fusionsprodukten, die für chimäre Proteine kodieren [74]. Ca. 80 % der t(4;11)-Leukämiepatienten zeigen die beiden reziproken Fusionsallele *MLL*·*AF4* bzw. Derivatchromosom 11 (*der11*) und *AF4*·*MLL* bzw. Derivatchromosom 4 (*der4*), während etwa 20 % nur das *MLL*·*AF4*-Allel aufweisen. Der fehlende *AF4*·*MLL*-Nachweis ist auf komplexe Rearrangements zurückzuführen [78] [171] [172].

### 2.6.1 FUSIONSPROTEIN MLL•AF4

Das chimäre *MLL•AF4* entsteht durch die Fusion einer 5'-Sequenz von *MLL* mit einer 3'-Sequenz von *AF4* und kodiert das MLL•AF4-Protein mit ca. 2100-2400 AS sowie 230-260 kDa in Abhängigkeit von der Position der Doppelstrangbrüche in beiden Genen. Neben den *AT-hooks* und der MT-Domäne vom MLL besitzt das Fusionsprotein ebenfalls die funktionellen AF4-Domänen pSer, NLS und CHD (vgl. Abbildung 2-6) [77] [173]. Zytogenetische und molekulare Studien zeigen die Relevanz des *der11* für die Leukämogenese, wobei dessen Effekt auf einem *gain-of-function*-Mechanismus beruht [77] [174] [175]. MLL•AF4 exprimierende leukämische Blasten arretieren in einem frühen Vorläuferstadium beruhend auf einer aberranten Expression von Targetgenen oder auf der Unfähigkeit, wichtige Gene für die Differenzierung zu induzieren, wobei die transkriptionellen Effekte von MLL•AF4 zelltypabhängig sind oder durch andere Genprodukte modifiziert werden [25] [174] [176] [177]. In verschiedenen Studien wurden Targetgene von MLL•AF4 identifiziert, welche in die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen involviert sind [178]. Durch die Hochregulation von Genen, die mit Neovaskularisierung und früher Hämatopoese assoziiert sind, beeinträchtigt MLL•AF4 die embryonale Blutbildung [179]. Eine MLL•AF4-abhängige Aktivierung wurde z. B. für FLT3 und RUNX1 gezeigt [180] [181]. FLT3 scheint zudem kooperierend mit MLL•AF4 die embryonale Hämatopoese zu hemmen, ist aber nicht ausreichend für die maligne Transformation [182] [183]. Variierende *HOXA*-Genexpressionsmuster erlauben die Einteilung in zwei t(4;11)-Subgruppen mit unterschiedlichen Charakteristika und vermutlich unterschiedlicher Leukämogenese. Außerdem ist die fehlende *HOXA*-Genexpression mit einer schlechten Prognose und hoher Rezidivrate verbunden [184] [185] [186].



**Abbildung 2-6: Das MLL•AF4-Protein**

Die Abbildung 2-6 veranschaulicht das MLL•AF4-Protein, welches aus der Fusion einer N-terminalen MLL-Sequenz mit einer C-terminalen AF4-Sequenz entsteht und die Eigenschaften dieser beiden Proteine in Abhängigkeit von den jeweiligen funktionellen Domänen vereint.

AT: *AT-hooks*; SNL1 und SNL2: *Speckled nuclear localization*; MT: Methyltransferase-Domäne; pSer: Serinreiche Domäne; NLS: Kernlokalisationssequenz; CHD: C-terminale Homologiedomäne.

Während MLL-lacZ-Fusionen in Mäusen onkogene Transformationen auslösen [187], scheint MLL-AF4 alleine nicht ausreichend für fehlende Differenzierung, verändertes Zellwachstum sowie den Verlust der Apoptosesensitivität und damit für die maligne Transformation [174] [177]. Auf unterschiedlichen *knock in-* bzw. *inverter*-Strategien beruhende murine Mll-Af4- bzw. Mll-AF4-Modelle mit langer Latenzzeit bestätigen, dass für eine Tumorentwicklung das *der11* alleine nicht ausreicht [188] [189]. Die Zellzykluskontrolle durch MLL-AF4 als mögliche Ursache für die Resistenz gegenüber Zelltodverursachenden Stimuli zeigt sich in der Inhibierung des Zellwachstums, verbunden mit der Reduktion von Zellen in der S-Phase und deren Akkumulation in der G1Phase. Außerdem weisen t(4;11)-Zelllinien eine erhöhte Verdopplungszeit mit einer geringeren Anzahl an Zellen im Zellzyklus auf sowie eine Herunterregulation von Genen, die in die Zellproliferation involviert sind [190] [191] [192] [193]. Im Gegensatz dazu sind die Expressionslevel der *HOX*-Gene *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXC6* ebenso wie des *HOX*-Coregulators *MEIS1* erhöht [177] [191] [192]. Experimente, bei denen *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* und *MEIS1* runterreguliert werden, bedingen eine Beeinträchtigung der Proliferationskapazität [194]. Ebenso führt IL24 über die Inhibierung von *HOXA9* verbunden mit der Aktivierung von *MEIS1* ebenso wie die Hemmung des Calciumbindenden Proteins S100A6 zu antiangiogenetischen Effekten und zur Caspase 8-Caspase 3-vermittelten Apoptose [195]. Auch die durch MLL-AF4 gesteigerte Expression des an der Zellzyklusprogression beteiligten cyclinabhängigen Kinaseinhibitors CDKN1B (p27, Kip1) in den Vorläuferzellen des Knochenmarks resultiert in einer reduzierten Anzahl an Zellen im Zellzyklus und gibt einen Hinweis auf die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [196]. Ein siRNA vermittelter MLL-AF4-*knock-down* in t(4;11)-Zelllinien beeinflusst Proliferation und Klonogenität. Daraus resultiert eine gesteigerte Apoptoserate, die reduzierte Expression von *HOXA7*, *HOXA9* und *MEIS1* sowie die Inhibierung der Expression von CD133, einem Indikator für hämatopoetische Differenzierung [197]. Weitere siRNA-vermittelte MLL-AF4-*knock-down*-Experimente verknüpfen das *der11* mit der Telomerase, einer Schlüsselkomponente der normalen und malignen Selbsterneuerung. Durch die resultierende transkriptionelle Reduktion von TERT, der Telomerase-Proteinuntereinheit, wird durch den *knock down* auch die Aktivität der Telomerase vermindert [198]. Die MLL-AF4-Überexpression in CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen erhöht das klonogene Potential der Vorläuferzellen sowie deren Proliferation [199]. Ursache für die MLL-AF4-abhängigen Veränderungen kann die Ras-

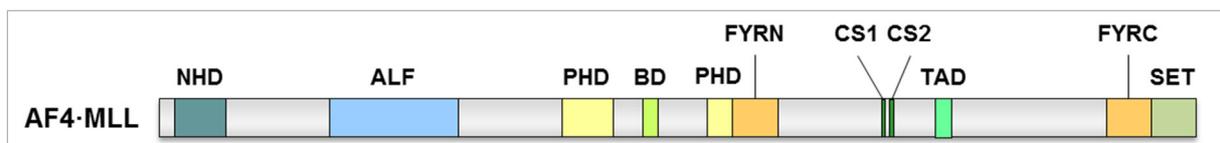
abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors ELK1 über die MAP-Kinase-Signalkaskade sein. MLL-AF4 bedingt, wahrscheinlich durch die CHD vermittelt, die Hochregulation der Rezeptor-Tyrosinkinase EPHA7, weshalb im weiteren Verlauf die MAP-Kinase ERK vermehrt phosphoryliert und ELK1 aktiviert werden [200] [201] [202]. Ein *MLL-AF4<sup>+</sup> KRAS Mutation<sup>+</sup>* transgenes Mausmodell beschreibt das aktivierte KRAS-Protein als potenten Faktor für den frühen Ausbruch von ALL mit MLL-AF4 [203]. Für die Leukämogenese könnte auch die durch aberrante DNA-Methylierung geringere Expression von microRNAs wie *miR-143* bzw. *miR-142-3p* relevant sein, wodurch MLL-AF4 vermehrt exprimiert wird und ein Proliferationsvorteil mit reduzierter Apoptoserate entsteht [204] [205].

*In vitro*-Experimente mit beiden MLL-Fusionsproteinen verdeutlichen, dass MLL-AF4 die Apoptoseresistenz erhöht und die *HOX*-Genexpression alleine induzieren kann, während AF4·MLL zur Wachstumstransformation von Zellen führt. Allerdings resultiert die Kombination der beiden in der höchsten Wachstumsrate, dem Erhalt des Zellzyklus auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und der größten Resistenz gegenüber apoptotischen Triggern. Deshalb scheint der pathologische Krankheitsmechanismus der t(4;11)-Leukämie von den Eigenschaften beider MLL-Fusionsproteine abhängig zu sein [206]. MLL-AF4 scheint damit in die Leukämogenese involviert zu sein, aber ein *second hit* ist notwendig [199] [179] [206] [207].

## 2.6.2 FUSIONSPROTEIN AF4·MLL

Das chimäre *AF4·MLL* entsteht durch die Fusion einer 5'-Sequenz von *AF4* mit einer 3'-Sequenz von *MLL* und kodiert für das AF4·MLL-Protein mit ca. 2.800-3.200 AS sowie 300-350 kDa in Abhängigkeit von der Position der Doppelstrangbrüche in beiden Genen. Entsprechend dem für die Spaltung von MLL beschriebenen Mechanismus [85] [86] [88] erfolgt die Taspase 1-vermittelte Proteolyse von AF4·MLL in zwei Fragmente [161] sowie nach deren Heterodimerisierung die Assemblierung eines Multiproteinkomplexes [167]. Durch die Zusammenlagerung der beiden AF4·MLL Fragmente wird die proteasomale Degradierung inhibiert und das Fusionsprotein stabilisiert, woraus dessen Akkumulation folgt. Konträr dazu bleibt die Bindung der SIAH-Ligasen unbeeinflusst, weshalb diese funktionell inaktiviert werden, verbunden mit dem Verlust ihrer Fähigkeiten, Apoptose oder Zellzyklusarrest zu induzieren und somit als Tumorsuppressor zu agieren [161] [208] [209]. Das AF4·MLL-Protein vereint Funktionen beider Wildtypproteinkomplexe und führt durch eine wesentlich er-

höhte Aktivität der Kinase P-TEFb, die für die Aktivierung der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) zur Elongation notwendig ist, sowie gesteigerte H3K4- und H3K79-Methylierungen zu epigenetischen Veränderungen und zellulärer Umprogrammierung [161] [167]. Wird AF4-MLL in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) überexprimiert, kommt es zum Verlust der Kontaktinhibition, einem typischen Merkmal für das wachstumstransformierende Potential von Zellen [161]. Die erhöhte Wachstumsrate wird ausgeglichen durch eine gesteigerte Apoptoserate [206]. Ein Mausmodell zeigt, dass AF4-MLL in der Lage ist, pro-B ALL oder CLP ALL auszulösen. In Mäusen, die nicht erkrankten, konnte hierbei zwar MLL-AF4, aber kein AF4-MLL nachgewiesen werden [210]. Untersuchungen der Genexpression demonstrieren die durch AF4-MLL verursachte Deregulierung von 660 Genen, darunter 36 Transkriptionsfaktoren [206]. Des Weiteren ist die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RUNX1 interessant, welcher von MLL-AF4 aktiviert wird und somit ein Beispiel für eine Transformation darstellt, bei der zwei onkogene Fusionsproteine kooperieren. RUNX1, dessen Expression mit einem schlechten Therapieerfolg assoziiert ist, aktiviert Targetgene in t(4;11)-leukämischen Zellen und ist essentiell für das Wachstum dieser Zellen [181] [211]. Auch wenn AF4-MLL bis jetzt weniger gut untersucht ist als MLL-AF4, verdeutlichen die Ergebnisse bisheriger Experimente die onkogenen Eigenschaften von AF4-MLL, das immer wieder Gegenstand kontroverser Diskussionen ist [212] [213], unter anderem wegen des Nichtvorkommens in 20 % der t(4;11)-ALLs [171].



**Abbildung 2-7: Das AF4-MLL-Protein**

Die Abbildung 2-7 veranschaulicht das AF4-MLL-Protein, welches aus der Fusion einer N-terminalen AF4-Sequenz mit einer C-terminalen MLL-Sequenz entsteht und die Eigenschaften dieser beiden Proteine in Abhängigkeit von den jeweiligen funktionellen Domänen vereint. In Abhängigkeit des Bruchpunktes ist die erste PHD-Domäne (PHD1-3) teilweise unvollständig vorhanden.

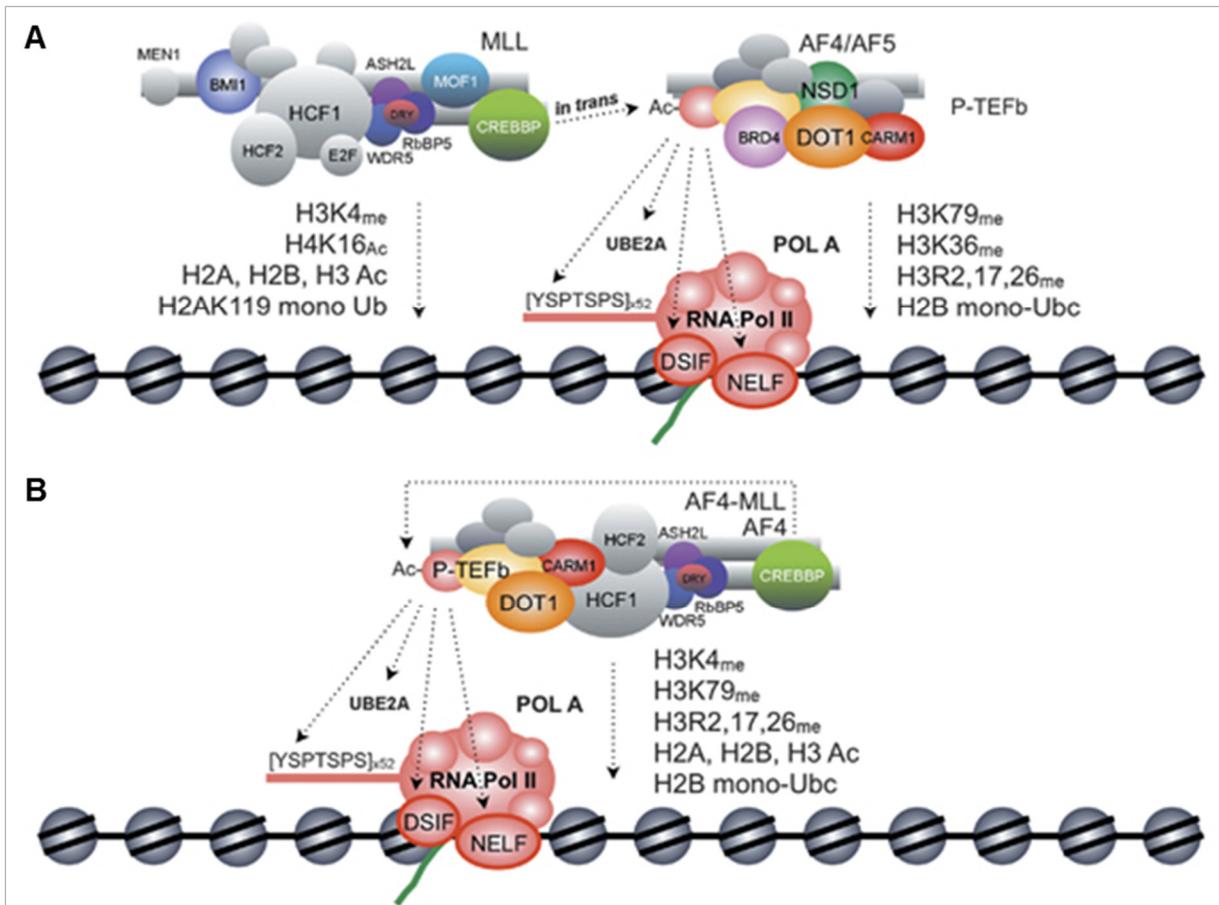
NHD: N-terminale Homologiedomäne; ALF: *AF4/LAF4/FMR2*-Domäne; PHD: *Plant Homeodomain*; BD: Bromodomäne; FYRN/FYRC: Heterodimerisierungsdomänen; CS1/CS2: Erkennungssequenzen für proteolytische Spaltung durch Taspase 1; TAD: Transaktivierungsdomäne; SET: *Suppressor of variegation (Su(var)3-9)*, *Enhancer of zeste*, and *Trithorax (SET)*-Domäne.

## 2.7 KOMPONENTEN DES AF4-MPC UND AF4·MLL-MPC IM VERGLEICH

Das Protein AF4 ist genauso wie das Fusionsprotein AF4·MLL eine Komponente eines Multiproteinkomplexes (MPC) (vgl. Abbildung 2-8). Als erster Interaktionspartner des AF4-Proteins wurde das Protein AF9 identifiziert, dessen kodierendes Gen wie das *AF4*-Gen ein TPG des *MLL*-Gens darstellt [163]. Im Folgenden konnte AF4 als Komponente eines zellulären, die transkriptionelle Elongation beeinflussenden MPCs bestimmt werden, der auch das besonders an der AF4-Bindestelle annähernd zu AF9 homologe Protein ENL, AF10 sowie die H3K79-Methyltransferase DOT1L umfasst [164]. Die Vermutung über weitere Komponenten entstammen der Kenntnis über die Bindung von ENL an AF4, AF5, AF9 und AF10 [164] sowie die Interaktion zwischen AF5 und dem positiven Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb. Dieser stellt ein Dimer aus dem Cyclin T1 (CCNT1) und der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (CDK9) dar mit der Funktion, die CTD der RNA Pol II zu phosphorylieren [214]. In einem Mausmodell führte die Interaktion von Af4 mit Af9, Af10 und Enl zur P-TEFb-Aktivierung sowie zu Dot1-abhängigen H3K79<sub>me3</sub>-Signaturen [165]. Der analoge, humane MPC AEP (AF4/5, ENL, P-TEFb) resultiert aus der Heterodimerisierung von AF4 mit AF5 sowie der Assoziation mit ENL und P-TEFb [166]. Durch Western Blot-Analysen und massenspektrometrische Experimente mit dem aufgereinigten AF4-MPC konnten bisher gefundene Komponenten verifiziert, aber auch neue Interaktionspartner identifiziert und anschließend mittels Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Während der C-terminale Teil des AF4 an ENL bzw. AF9, AF10 und DOT1L bindet, interagiert der AF4 N-Terminus mit P-TEFb, dem Bromodomänen-Protein BRD4, dem Transkriptionsfaktor NFκB1 (RELA/p65 und p50), dem Nucleophosmin NPM1, der Arginin-N-Methyltransferase CARM1, dem P-TEFb-inaktivierenden Protein HEXIM1 und der H3K36-/H4K20-Histonmethyltransferase NSD1. Der AF5-Nachweis funktionierte aufgrund der Ähnlichkeit zum AF4 nur massenspektrometrisch [167].

Der MPC um das Fusionsprotein AF4·MLL enthält ASH2L, RbBP5, WDR5, HCF1 und HCF2, welche als Komponenten des MLL-MPC über die C-terminale MLL SET-Domäne interagieren [167]. Andererseits sind Faktoren des AF4-MPC involviert, die an den AF4 N-Terminus binden. Wie das AF4-Protein kann auch AF4·MLL den MPC AEP bilden [166]. Auch die später identifizierten am AF4 N-Terminus bindenden Komponenten des AF4-MPC konnten dem AF4·MLL-MPC zugeordnet werden. Aus-

genommen sind hiervon AF5 und BRD4, die ausschließlich im AF4-MPC detektierbar waren. Stattdessen war hier das Wildtypprotein AF4 nachweisbar [167].

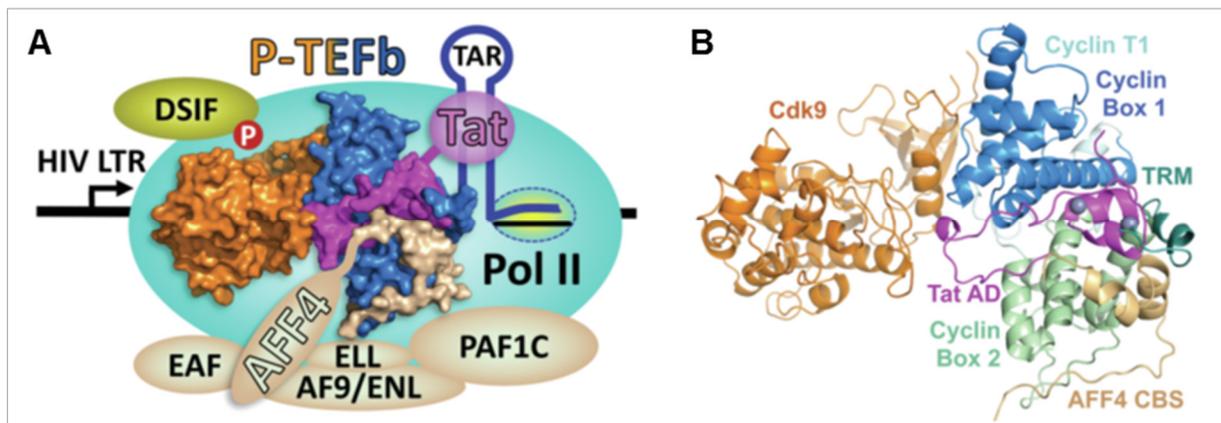


**Abbildung 2-8: Schematische Darstellung MLL-, AF4- und AF4·MLL-Multiproteinkomplexe**

Die Abbildung 2-8 aus [167] illustriert die Multiproteinkomplexe um AF4 und MLL sowie AF4·MLL. **A)** Darstellung der Zusammensetzung sowie der molekularen Funktionen des MLL-MPCs (links) und des AF4-MPCs (rechts). Über Chromatinmodifikationen bedingt der MLL-MPC die Aktivierung von Promotorregionen. H3K4-Methylierungen erfolgen durch den MLL SET-Domänen Komplex, H4K16-Acetylierungen durch die Histonacetyltransferase MOF und generelle Histonacetylierungen durch das CREB-bindende Protein CREBBP. Des Weiteren bewirkt das *Polycomb Group* Protein BMI-1 die Monoubiquitinylierung von H2AK119. Die Aktivierung der RNA Pol II erfolgt durch den AF4-MPC. Befindet sich diese in der elongierenden Phase, wirken DOT1L, NSD1 und CARM1 als Komponenten des AF4-MPC chromatinmodifizierend. **B)** Darstellung der Zusammensetzung und der molekularen Funktionen des AF4·MLL-MPC. Dieser verbindet Eigenschaften des MLL-MPCs mit denen des AF4-MPCs unter Veränderung der Chromatineigenschaften.

### 2.7.1 BETEILIGUNG VIRALER PROTEINE AM BEISPIEL DES HIV-1 TAT-PROTEINS

Dem an der Ausbildung der oben genannten MPCs (vgl. 2.7) beteiligten P-TEFb wurde neben der physiologischen Funktion auch eine Rolle bei der viralen Infektion zugeschrieben. P-TEFb kann besonders über die Untereinheit CCNT1 und weniger über CDK9 mit dem HIV-1 Tat Protein interagieren [215] [216]. Wegen der Konkurrenz des Tat-Proteins mit HEXIM1 um die Bindung an CCNT1 bewirkt Tat die P-TEFb-Aktivierung durch die HEXIM1-Dissoziation [217]. Dadurch wird dem HIV-1 das Verlassen der latenten Phase der Replikation ermöglicht [218] und die Tat vermittelte Elongation über die Bindung von P-TEFb am HIV-1 *long terminal repeat* (LTR) Promotorelement aktiviert [219] [220]. Zusätzlich ist das Tat-Protein für die Modifizierung der physiologischen Zusammensetzung der RNA Pol II-assoziierten MPCs, den Superelongationskomplexen (SEC) bzw. die Veränderung deren Aktivität verantwortlich [221] [222] [223] [224]. Letztendlich konnte das HIV-1 Tat-Protein zwei verschiedenen Komplexen zugeordnet werden. Der gemeinsam mit P-TEFb, einem der MLL-Fusionspartner AF4, AF5, AF9, ENL oder ELL sowie dem Polymerase-assoziierten Faktor PAF1 gebildete MPC Tatcom1 (vgl. Abbildung 2-9) repräsentiert den größeren der beiden Komplexe. Dagegen umfasst der MPC Tatcom2 neben dem Tat-Protein auch P-TEFb und eine stabilisierte 7SK snRNA in Abwesenheit von HEXIM1 [225] [226].



**Abbildung 2-9: Der Tatcom1-Komplex**

Die Abbildung 2-9 aus [227] zeigt schematisch die Zusammensetzung des Tatcom1-MPC. **A)** P-TEFb aus den Untereinheiten CDK9 (orange) und CCNT1 (blau) bindet HIV-1 Tat (lila) und AF5 (AFF4, beige). Alternativ zu AF5 können auch AF4, EAF1/2, ELL1/2/3 oder AF9/ENL im Komplex präsent sein. Über den PAF1-Komplex (beige) wird der Kontakt zu RNA Pol II hergestellt, woraus die Aktivierung der Transkription sowie die produktive HIV-Infektion resultiert. **B)** Orange: CDK9; Blau: CCNT1 Box1; Türkis: CCNT1 TRM (Tat-TAR *recognition motif*); Hellgrün: CCNT1 Box 2; Lila: Tat AD; Beige: AFF4 CBS (CCNT1 *binding site*); Blaue Kugeln: Tat-Zinkionen

## 2.8 RELEVANZ VIRALER PROTEINE FÜR KREBSERKRANKUNGEN

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden virale Infektionen als Grundlage für die Krebsentstehung beobachtet [228] [229]. Für einige Viren wie u. a. das Epstein-Barr-Virus oder humane Papillomviren wurde deren Beteiligung an der Krebsentstehung nachgewiesen. Besonders die Arbeiten von Harald zur Hausen über die Rolle von Humanen Papillomviren (HPV) bei der Entstehung von Zervixkarzinomen und der dafür verliehene Nobelpreis für Physiologie und Medizin haben die Assoziation zwischen viraler Infektion und Krebs in den allgemeinen Fokus gerückt [230]. Viren sind Organismen, deren Replikation an die Infektion eines Wirtes gekoppelt ist. Für die virale Replikation sowie Transkription und Translation ist der Stoffwechsel des Wirtes notwendig. Während die Interaktion viraler Proteine mit den Transkriptionskomplexen des Wirtes sowie deren Nutzung für die virale Transkription für das HIV-1 bereits gezeigt wurde (vgl. 2.7.1), bleibt diese Frage für Proteine anderer Viren zu klären.

Im Folgenden werden die Viren und besonders deren jeweilige *immediate-early*-Proteine kurz beschrieben, die für diese Arbeit relevant sind.

### 2.8.1 HUMANES ZYTOMEGALIEVIRUS

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist ein Virus mit doppelsträngiger DNA (dsDNA-Virus) aus der Gruppe der humanen Herpesviren (HHV-5) mit relativ hoher Prävalenz. Eine HCMV-Infektion verläuft bei intaktem Immunsystem aufgrund geringer Virulenz meistens asymptomatisch. Allerdings handelt es sich um eine latente lebenslang persistierende Infektion mit Phasen kurzer Reaktivierung beginnend mit dem Eintritt in den lytischen Zyklus [231]. Die temporäre dreiphasige Synthese der viralen Proteine resultiert in *immediate-early*- (IE, 0-2 h), *delayed-early*- (E, <24 h) und *late*-Phase-Proteinen (L, <24 h) [232]. Zu den ersten translatierten Proteinen im lytischen Zyklus gehören IE1 (UL123) und IE2 (UL122) [233], welche sich ausschließlich im C-Terminus durch ein Exon unterscheiden [234] [235]. Als Transaktivatoren viraler und humaner Promotoren sind sie u. a. für die Expression der E- und L-Proteine verantwortlich [236]. Während das mindestens 10fach stärker translatierte IE1 [237] [238] ausschließlich aktivierende Domänen besitzt [239] [240] [241], intrinsische Kinase-Aktivität aufweist [242] und nur über Transkriptionsfaktoren wie z. B. NFκB mit der DNA interagiert [243], zeigt IE2 auch direkt an DNA-bindend [244] [245] N-terminal aktivierende [239] und C-terminal repressive Aktivität [246].

### 2.8.2 EPSTEIN-BARR-VIRUS

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein Virus mit doppelsträngiger DNA (dsDNA-Virus) aus der Gruppe der humanen Herpesviren (HHV-4) [247]. Weltweit ist fast jeder Erwachsene mit dem lebenslang latent persistierenden Virus infiziert, aber bei intaktem Immunsystem verläuft die Infektion asymptomatisch [248]. Allerdings wurde neben der bei einer Primärinfektion möglichen infektiösen Mononukleose [249] die Assoziation zu Krebserkrankungen [250], aber auch zu Autoimmunerkrankungen gezeigt [251] [252]. Bei einer spontanen Reaktivierung induzieren die von den ersten transkribierten Genen kodierten *immediate early*-Proteine BZLF1 (Zta) und BRLF1 (Rta) den lytischen Zyklus [253] sowie im Folgenden die Expression der viralen *early* (E) und *late*-Gene (L) [254]. BZLF1 gehört zur Familie der basischen Leucin-Zipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren, aktiviert neben der eigenen auch die Expression vieler EBV-Gene und ist an der viralen Replikation beteiligt. Außerdem werden zahlreiche zelluläre Gene, welche mit dem viralen Lebenszyklus, der Zellzyklusprogression, dem Zellwachstum, der Differenzierung und der Apoptose assoziiert sind, aktiv durch BZLF1 beeinflusst [255].

### 2.8.3 HUMANE PAPILLOMVIREN

Humane Papillomviren (HPV) mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) sind die Ursache von Papillomen. Bei Infektionen des Genitaltrakts sind HPVs, aber auch bei diversen anogenitalen Karzinomen (Zervix, Vulva, Vagina, Penis) sowie nicht-anogenitalen Krebsarten im Kopf- und Nackenbereich sind HPVs involviert. Deren Genom ist in 3 Domänen unterteilbar: Neben der frühen (*early*, E) und der späten (*late*, L) Region existiert die nichtkodierende regulatorische Region (NCR). Die von der E-Region kodierten Onkoproteine E6 und E7 des HPV-16 stellen Zn-bindende Proteine dar, welche mit Tumorsuppressor-Proteinen interagieren. Die Bindung von E6 an p53 resultiert in dessen Ubiquitinylierung sowie anschließender Degradation, wodurch der Zellzyklusarrest bzw. die Induktion der Apoptose inhibiert werden. Durch die Interaktion des E7 mit dem Retinoblastom-Protein (pRb) wird dieses funktionell inaktiviert. Die resultierende fehlende Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F1 ermöglicht dessen Bindung an DNA sowie die Induktion von Zellwachstum und Proliferation. Des Weiteren sind E6 und E7 involviert in die Zelltransformation und die Immortalisierung [256].

### 3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Diagnose einer Leukämie verbunden mit einer chromosomalen Aberration unter Beteiligung des *MLL*-Gens bedeutet eine schlechte Prognose und die betroffenen Patienten werden normalerweise entsprechend Hochrisikoprotokollen behandelt (vgl. 2.3). Besonders häufig treten Rearrangements des *MLL*-Gens bei Säuglingen mit der Diagnose einer ALL auf, welche eine wesentlich schlechtere Prognose aufweisen als ältere Kinder und Erwachsene dieses Leukämietyps. Studien zur Untersuchung der Korrelation zwischen klinischen Merkmalen und molekularen Charakteristika haben eine Abhängigkeit des *Outcomes* von der Verteilung des Bruchpunkts im *MLL*-Gen erkennen lassen [56]. Dabei sind Bruchpunkte in *MLL* Intron 11 mit ALLs bei Säuglingen bzw. t-AMLs [53] und einer schlechten Prognose assoziiert, während diese bei älteren Patienten und dem damit häufigeren Vorkommen des Bruchpunkts in *MLL* Intron 9 oder 10 signifikant besser aussieht [56]. Aufgrund des Bruchpunkts in *MLL* Intron 11 liegt die PHD1-Domäne im reziproken Fusionsprotein verkürzt vor, weshalb die daraus resultierenden Konsequenzen analysiert werden sollten. Neben einer möglichen veränderten Funktion des PHD1 ist auch eine modifizierte Konformation der gesamten *MLL* PHD-Domäne, besonders der PHD-Finger 1-3, wahrscheinlich. Die Tatsache, dass der PHD3 über seine Fähigkeit zur Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen einerseits und der Interaktion mit dem CYP33 andererseits einen ambivalenten Charakter des *MLL*- Proteins bedingt (vgl. 2.4.1), verstärkt die Relevanz der Analyse sowohl der unmodifizierten als auch der verkürzten PHD1-3-Domäne. Zur genaueren Untersuchung sollten erst in *Yeast Two-Hybrid* (Y2H)-Versuchen und später in Koimmunpräzipitations (CoIP)-Experimenten beide PHD1-3-Varianten auf ihre Bindungsfähigkeit an CYP33 sowie dessen RRM-Domäne allein getestet werden. Zusätzlich sollten beide Varianten auf ihre Kapazität zur Homodimerisierung überprüft werden. Von weiterem Interesse ist die Tatsache, dass für die PHD3-Domäne durch alternatives Spleißen an der *MLL* Exon 15/Exon 16-Verknüpfung 4 differente Varianten bekannt sind (vgl. 2.4.2). Daraus ergibt sich ein besonderes Interesse für den PHD3 und dessen Interaktionspartner. Wie für die PHD1-3-Domänen sollte in Y2H-Untersuchungen und anschließenden CoIP-Versuchen die Bindung von CYP33 sowie dessen RRM-Domäne allein an die 4 differenten PHD3-Finger getestet werden. Ebenso sollte die Fähigkeit zur Homodimerisierung bzw. zur Dimerisierung mit einer anderen PHD3-Variante untersucht werden.

Des Weiteren sollten 4 PHD3-Versionen auf Interaktionen mit den beiden PHD1-3-Varianten getestet werden.

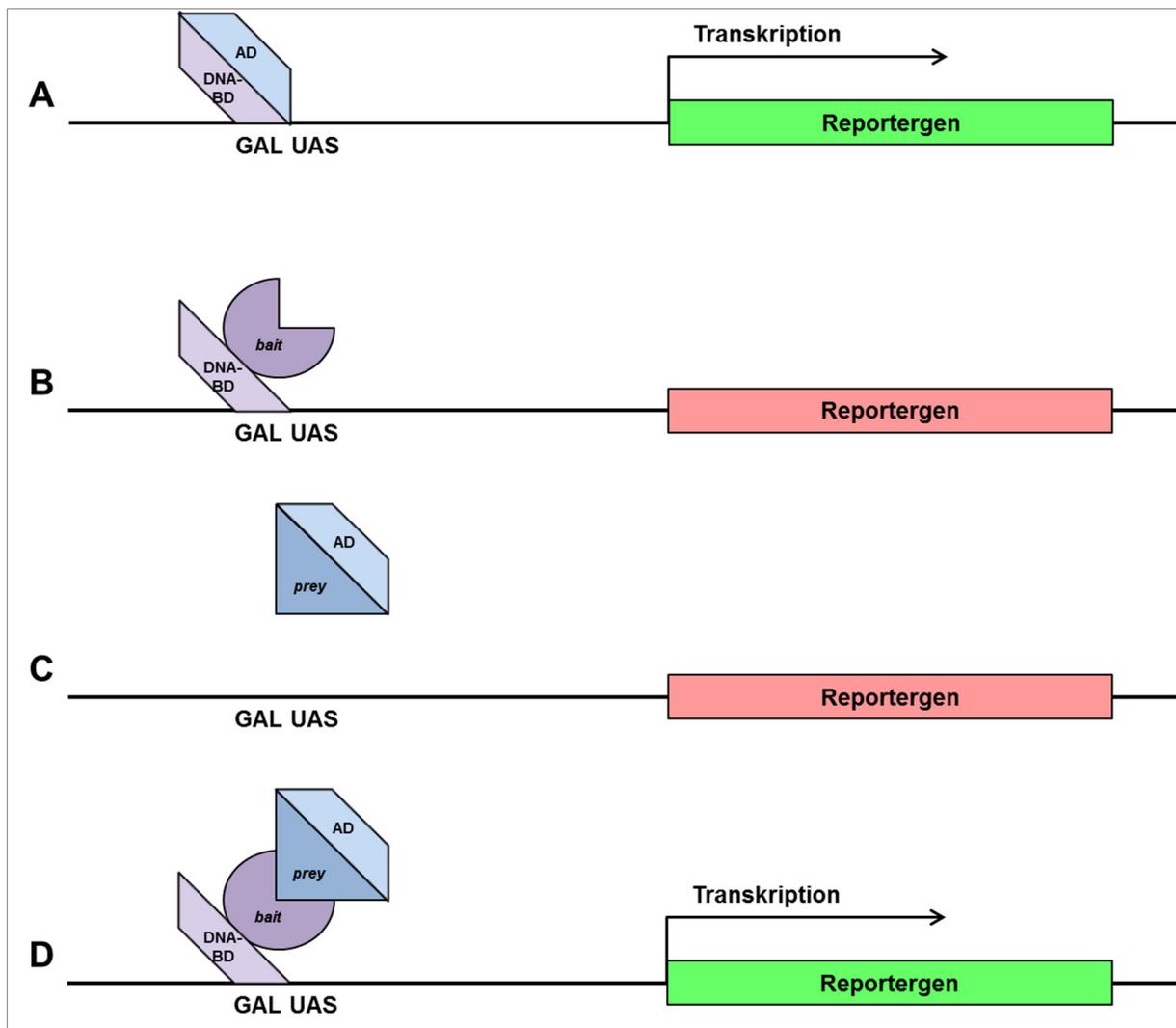
Neben den Untersuchungen mit den beiden differenten MLL PHD1-3-Varianten sowie den verschiedenen MLL PHD3-Fingern sollte das Y2H-System zur weiteren Aufklärung des AF4-Multiproteinkomplexes (MPC) sowie des AF4·MLL-MPC genutzt werden. Das für das AF4-Protein kodierende *AF4*-Gen ist das häufigste TPG in ALL-Patienten mit einer *MLL*-Translokation, welche eine extrem schlechte Prognose sowie eine mit hoher Therapieresistenz assoziierte Rückfallquote aufweisen (vgl. 2.3.1). Die aus der resultierenden t(4;11)(q21;q23)-Translokation entstehenden Fusionsproteine AF4·MLL und MLL·AF4 sind ebenso wie die Wildtypproteine AF4 und MLL an der Assemblierung von MPCs beteiligt (vgl. 2.7 und Abbildung 2-8). Besonders das reziproke AF4·MLL scheint in Bezug auf den Therapieerfolg für die Leukämogenese entscheidend zu sein [63] [67]. In verschiedenen Untersuchungen gelang die Identifizierung und Verifizierung bereits bekannter aber auch neuer Komponenten der beiden MPCs um AF4 und AF4·MLL [167]. Die Verwendung des Y2H-Systems sollte genauere Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen der Komplexe liefern.

Aufgrund der Kenntnis über die Beteiligung von viralen Proteinen an der Entstehung einiger Krebsarten und die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle für die virale Replikation durch virale Proteine (vgl. 2.7.1 und 2.8), stellt sich die Frage über die mögliche Interaktion viraler Proteine mit den Komponenten der AF4- und AF4·MLL-MPCs. Eine Rekrutierung der Superelongationskomplexe (SECs) durch virale Proteine zur verbesserten Initiierung der viralen Replikation bzw. der lytischen Phase erscheint plausibel. Im Rahmen seiner Doktorarbeit konnte Dr. Bastian Scholz das AF4 als Kofaktor viraler Proteine, besonders der HCMV und EBV *immediate early* (IE)-Proteine, identifizieren. Neben dem Einfluss des HCMV IE1 auf AF4-vermittelte Effekte wurde dessen Integrität in den AF4-MPC gezeigt. Außerdem konnten die HCMV und EBV IE-Proteine die AF4-MPCs induzieren sowie deren funktionelle Verfügbarkeit erhöhen. Aus diesen Ergebnissen resultiert die mögliche Identifizierung von Interaktionen zwischen IE-Proteinen und AF4 sowie weiteren Komponenten der AF4- und AF4·MLL-MPCs mithilfe des Y2H-Systems.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 YEAST TWO-HYBRID SYSTEM

Viele Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen und resultieren aus Experimenten mit dem *Yeast Two-Hybrid* (Y2H)-System. Dieser transkriptionelle Assay erlaubt die Identifizierung von Protein-Interaktionen *in vivo* in Hefen, wobei entweder das Durchsuchen einer Bibliothek neue Interaktionspartner für ein bekanntes Protein identifiziert oder das Interaktionspotential zweier Proteine getestet wird. Das verwendete „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System“ (Clontech) nutzt die Eigenschaften des *Saccharomyces cerevisiae* GAL4-Proteins, das einen Transkriptionsfaktor mit zwei trennbaren, funktionell essentiellen Domänen darstellt. Während die N-terminale DNA-bindende Domäne (BD) spezifisch an strangaufwärts gelegene Aktivatorsequenzen (UAS) bindet, kann die C-terminale aktivierende Domäne (AD) die Transkription strangabwärts gelegener Gene induzieren (vgl. Abbildung 4-1 A). Für den Y2H-Assay generiert man zwei Hybridfusionen mit Teilen des GAL4-Proteins. Auf der einen Seite wird die GAL4 DNA-BD mit dem „Köder“-Protein (*bait*) und andererseits die GAL4 AD mit dem „Beute“-Protein (*prey*) fusioniert. Die DNA-BD-*bait*-Fusion kann an DNA binden, aber keine Transkription induzieren. Konträr dazu wird die transkriptionelle Aktivierung durch das Fusionsprotein aus AD und *prey* unterbunden wegen dessen Unvermögen an DNA binden zu können (vgl. Abbildung 4-1 B und C). Erst durch eine Interaktion zwischen dem *bait*- und dem *prey*-Protein gelingt durch die nahe Lokalisation die Rekonstitution des GAL4-Proteins mit beiden funktionellen Domänen sowie die resultierende Transkription von Reportergenen (vgl. Abbildung 4-1). Diese Methode ist sensitiv für die Detektion relativ schwacher und transienter Proteininteraktionen, sodass auch spezifische für die Interaktion relevante Domänen eines Proteins lokalisierbar sind. Die Verwendung des haploiden MATa-Hefestammes AH109 eliminiert das Wachstum falsch-positiver Klone nahezu vollständig aufgrund der Verwendung von drei Reportergenen (*ADE2*, *HIS3* und *lacZ*), die durch GAL4 transkriptionell kontrolliert werden [257] [258] [259] [260].



**Abbildung 4-1: Das Y2H-Prinzip I**

Die Abbildung 4-1 verdeutlicht das Modell der transkriptionellen Aktivierung nach Rekonstitution der Aktivität des GAL4-Proteins. **A)** Das native GAL4-Protein bindet an DNA und induziert Transkription durch die Präsenz sowohl der DNA-BD als auch der AD. **B)** Das DNA-BD-*bait*-Fusionsprotein kann an DNA binden, aber die Transkription nicht aktivieren. **C)** Das AD-*prey*-Fusionsprotein ist unfähig an DNA zu binden, weshalb die mögliche transkriptionelle Aktivierung unterbunden wird. **D)** Aus der Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Protein resultiert die Wiederherstellung der beiden GAL4-Domänen in ausreichender Nähe und dadurch die transkriptionelle Aktivierung. Die Abbildung wurde modifiziert nach [258] [259] [260].

GAL UAS: GAL4 strangaufwärts aktivierende Sequenz; DNA-BD: GAL4 DNA-bindende Domäne; AD: GAL4 aktivierende Domäne; *bait*: „Köder“-Protein; *prey*: „Beute“-Protein

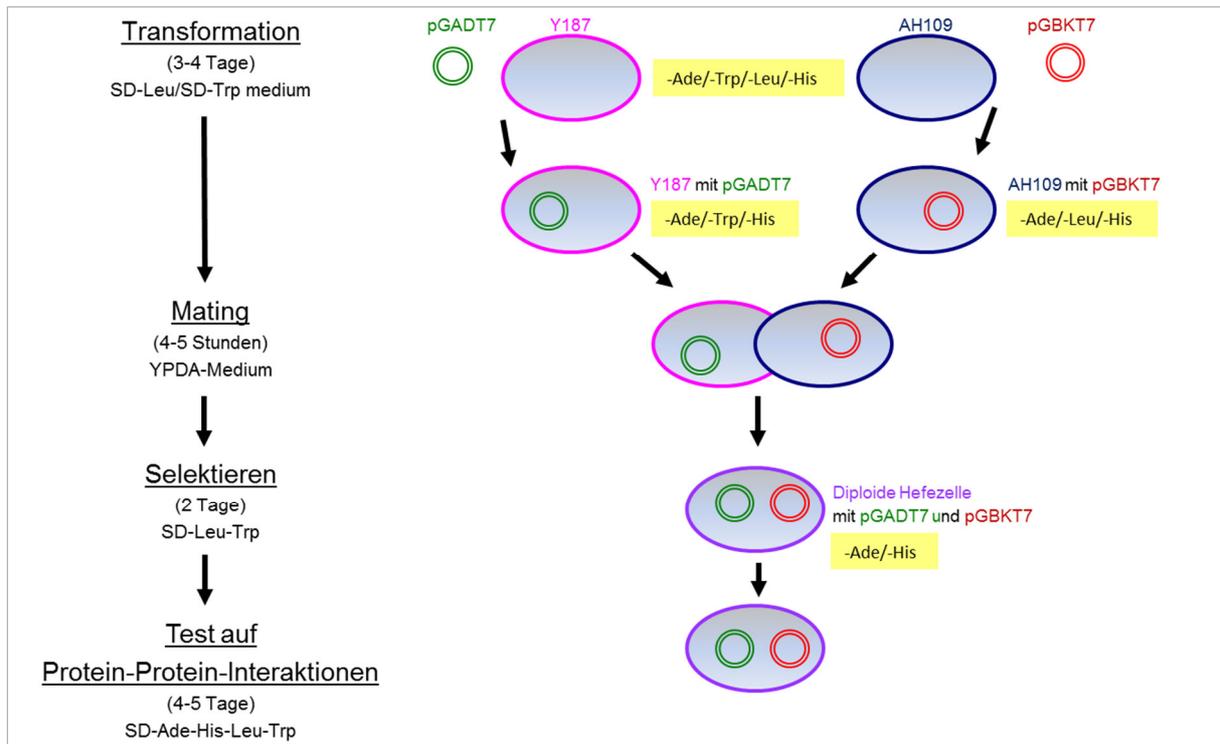
Neben dem haploiden MAT $\alpha$ -Hefestamm AH109 wurde der haploide MAT $\alpha$ -Hefestamms Y187 für die Y2H-Experimente verwendet. Beide sind auxotroph für Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan (Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>), weshalb sie nur auf Medien wachsen, die diese vier Aminosäuren enthalten (YPDA-Medium) oder durch die Aufnahme der Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 teilweise prototroph werden (vgl. Tabelle 4-1). Um die Klonierung zu erleichtern wurde die multiple Klonierungsstelle (MCS) der kommerziellen Plasmide teilweise verändert sowie die XhoI-Sequenz in der GAL4 DNA-BD des Vektors pGBKT7 mutagenisiert (vgl. Tabelle 4-2). Die Klonierung des zu testenden Proteins in den Vektor pGBKT7 führt zur Expression der DNA-BD-*bait*-Hybridfusion. Eine Transformation dieses Plasmids in den Hefestamm AH109 resultiert in dessen Trp-Prototrophie. Wird ein zu testendes Protein dagegen in den Vektor pGADT7 kloniert, entsteht die AD-*prey*-Fusion und eine entsprechende Transformation in den Hefestamm Y187 gewährt diesem Leu-Prototrophie. Nach der Transformation ist deshalb eine Selektion der Klone mit Plasmid auf den jeweiligen Minimalmedien (SD), SD-Trp für pGBKT7 in AH109 und SD-Leu für pGADT7 in Y187, möglich. Durch die Kreuzung (*Mating*) zweier Klone unterschiedlichen Stammes entsteht eine diploide Hefezelle, deren Selektion auf einem 2x-Minimalmedium (SD-Leu-Trp bzw. 2xDO) ermöglicht wird durch die Präsenz beider Expressionsvektoren. Ein solcher diploider Klon kann nur dann auf 4x-Minimalmedium (SD-Ade-His-Leu-Trp bzw. 4xDO) wachsen, wenn die beiden zu testenden Proteine eine Interaktion zeigen und dadurch den zwei funktionellen GAL4-Domänen ausreichend nahe Lokalisation gewähren (vgl. Abbildung 4-2).

**Tabelle 4-1: Eigenschaften der Expressionsvektoren für das Y2H-System**

Plasmid	GAL4 Domäne	Fusion	Hefeselektion	Bakterielle Selektion	Hefestamm
<b>pGBKT7</b>	DNA-BD	DNA-BD- <i>bait</i>	<i>TRP1</i>	Kanamycin	AH109
<b>pGADT7</b>	AD	AD- <i>prey</i>	<i>LEU2</i>	Ampicillin	Y187

**Tabelle 4-2: Modifizierung der pGADT7- und pGBKT7-MCS**

	Sequenz
<b>MCS „kommerziell“</b>	CCCGGG
<b>Modifizierte MCS</b>	GGATCCGAAGCTTCAGAATTCCCCGGGTCGCTCGAGA



**Abbildung 4-2: Das Y2H-Prinzip II**

Die Abbildung 4-2 skizziert die Durchführung der Y2H-Experimente. Beginnend mit der Transformation der für die Fusionsproteine kodierenden Plasmide pGADT7 und pGBKT7 in die beiden haploiden Hefestämme Y187 und AH109, folgen das Kreuzen (*Mating*) beider Stämme, die Selektion und der letztendliche Test auf Interaktionen.

YPDA: Vollmedium für Hefen; SD: Minimalmedium mit entsprechenden fehlenden Aminosäuren; Ade: Adenin; His: Histidin; Leu: Leucin; Trp: Tryptophan; pGADT7: Expressionsvektor mit GAL4 AD; pGBKT7: Expressionsvektor mit GAL4 DNA-BD; AH109: MAT $\alpha$ -Hefestamm; Y187: MAT $\alpha$ -Hefestamm

---

## 4.2 MLL PHD-FINGER

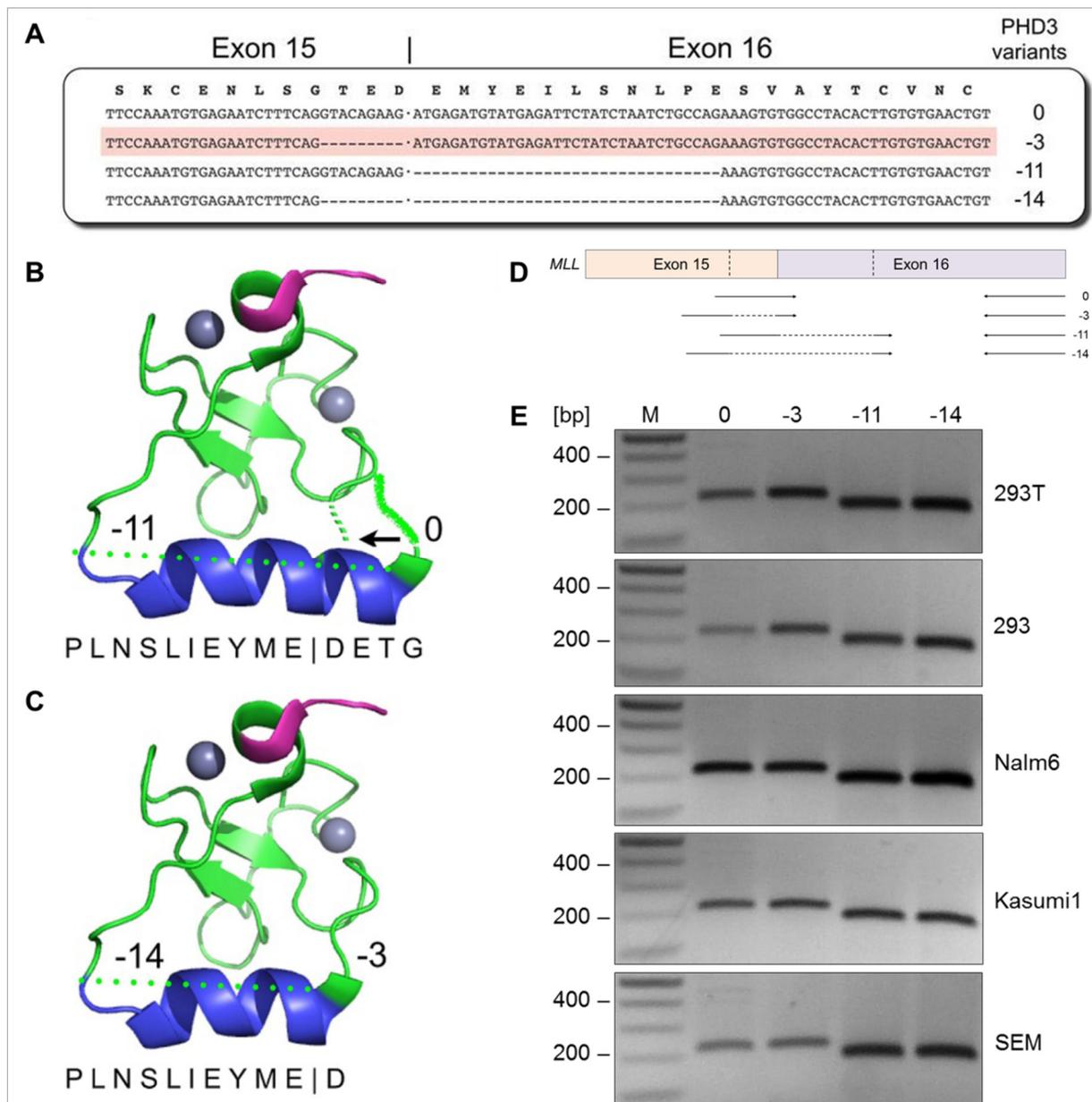
### 4.2.1 MLL PHD3-VARIANTEN

Der MLL PHD3-Finger wird von MLL Exon 15 und 16 kodiert. Aufgrund unterschiedlicher Spleißprozesse können an der Verknüpfung dieser beiden Exons 4 differente MLL-Transkripte entstehen. Neben dem normalen Transkript voller Länge (PHD3-0) gibt es Varianten mit 3, 11 bzw. 14 fehlenden Aminosäuren (PHD3-3, PHD3-11 und PHD3-14). Dem PHD3-3 fehlen die letzten 3 AS von Exon 15, während bei der PHD3-11-Variante die ersten 11 AS von Exon 16 nicht mehr vorhanden sind. Die vollständige Elimination aller 14 eben beschriebenen AS findet sich bei PHD3-14 (vgl. Abbildung 4-3 A) [78] [94] [133]. Infolgedessen ändert sich die Konformation der PHD3-Domäne. Die Veränderung betrifft vor allem die  $\alpha$ -Helix des PHD3-Fingers, die entweder eine Länge von 12 AS (PHD3-0) bzw. 9 AS (PHD3-3) aufweist oder vollständig fehlt (PHD3-11 und PHD3-14) (vgl. Abbildung 4-3 B und C). Wegen der Bedeutung dieser  $\alpha$ -Helix für Protein-Protein-Interaktionen mit der benachbarten BD-Domäne wird die Bindung an CYP33 sowie die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen beeinflusst.

### 4.2.2 SEMIQUANTITATIVE RT-PCR-EXPERIMENTE MIT DEN PHD3-VARIANTEN

Zur Überprüfung der Relevanz der 4 PHD3-Varianten wurden semiquantitative RT-PCR-Experimente mit 30 Zyklen durchgeführt. Die verwendeten Primer sind so spezifisch gestaltet, dass immer nur die Detektion einer PHD3-Modifikation (PHD3-0: 213 bp; PHD3-3: 218 bp; PHD3-11: 182 bp; PHD3-14: 183 bp) ermöglicht wurde (vgl. Abbildung 4-3 D).

In den 5 untersuchten Zelllinien HEK293T, HEK293, Nalm-6, Kasumi-1 und SEM konnte jedoch die nahezu ähnliche Transkription aller 4 Varianten gezeigt werden (vgl. Abbildung 4-3 E).



### Abbildung 4-3: MLL PHD3-Varianten

Die Abbildung 4-3, modifiziert nach [121], illustriert verschiedene Aspekte bezüglich der 4 differenten PHD3-Varianten, die aufgrund unterschiedlicher Spleißprozesse an der Verknüpfung von MLL Exon 15 und Exon 16 entstehen. **A)** Dargestellt wird neben der Aminosäuresequenz (Zeile 1) vor allem die Abfolge der Basen (Zeile 2-5). Die Nummern in der rechten Spalte benennen die PHD3-Varianten und geben jeweils die Anzahl der fehlenden Aminosäuren an. **B)** Darstellung der PHD3-Variante 0. Die blaue helikale Struktur wird durch das alternative Spleißen verändert und ist für den Kontakt zur BD-Domäne relevant. Bei der Variante -11 kommt es zur vollständigen Deletion der blauen helikalen Struktur. Pink: Linker zwischen PHD3 und BD-Domäne; Grau: Zinkionen. Die Buchstaben symbolisieren die Aminosäuresequenz von rechts nach links. **C)** Darstellung der PHD3-Variante -3. Es kommt erneut zur vollständigen Deletion der blauen helikalen Struktur bei Variante -14. **D)** Demonstration der Lage der Primer, die für das in E) dargestellte Experiment verwendet wurden. Die Primer sind so gewählt, dass sie immer nur eine PHD3-Variante detektieren können. **E)** Semiquantitative RT-PCR-Experimente an 5 verschiedenen Zelllinien mit den in D) dargestellten Primern. Alle 4 Spleißvarianten werden in den verwendeten Zelllinien nahezu gleich transkribiert.

### 4.2.3 MLL PHD1-3

Die MLL PHD1-3-Domäne wird von MLL Exon 11 bis Exon 16 kodiert (AS 1467-1660). Neben dieser Wildtypvariante (PHD1-3 bzw. PHD1-3A) wurde für die folgenden Experimente auch eine verkürzte Version von MLL Exon 12 bis Exon 16 ( $\Delta$ PHD1-3 bzw. PHD1-3B) verwendet, bei der die ersten 11 AS der PHD1-Domäne fehlen. Darunter befinden sich auch zwei Cysteine, die am Aufbau der Zinkfinger- bzw. PHD-Struktur beteiligt sind. Die Bedeutung der deletierten Variante liegt in ihrer Imitation einer chromosomalen Translokation mit dem Bruchpunkt in *MLL* Intron 11. Deren bevorzugtes Auftreten bei Säuglingen mit t(4;11)-Translokationen ist verbunden mit dem Alter von unter 6 Monaten und einer extrem schlechten Prognose. Konträr dazu liegen die gefundenen Bruchpunkte bei Erwachsenen primär in *MLL* Intron 9 oder 10. Da deren Prognose im Vergleich zu den Säuglingen besser ist, könnte die partielle Deletion des PHD1 bei einem Bruchpunkt in Intron 11 relevant für die Prognose und damit für die Wahl der Therapie sein [56].

### 4.2.4 Y2H-EXPERIMENTE MIT PHD3, PHD1-3 UND CYP33

Zur Überprüfung der Dimerisierungskapazität einerseits und der Fähigkeit an CYP33 zu binden andererseits wurden die folgenden Y2H-Experimente durchgeführt.

#### KLONIERUNG

Alle verwendeten Konstrukte wurden in die beiden modifizierten Y2H-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert.

Um sicher alle 4 PHD3-Varianten (PHD3-0, PHD3-3, PHD3-11 und PHD3-14) zu erhalten, wurden diese an der Stelle fehlender AS an der Verknüpfung von Exon 15 und Exon 16 in zwei Fragmente unterteilt, partiell in einer PCR aus cDNA amplifiziert, mit den jeweiligen unten genannten Restriktionsenzymen verdaut und in den pGEMT-Vektor ligiert. Mittels einer Ligations-PCR mit dem FW-Primer des Fragments I und dem RV-Primer des Fragments II wurden beide Fragmente zusammengefügt, erneut mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend in die modifizierten Y2H-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 ligiert. Während die FW-Primer von einer Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI flankiert werden, sind die RV-Primer mit einer XhoI-Erkennungssequenz versehen. Über die BamHI-Schnittstelle wurde anschließend der PHD3-Linker eingefügt.

Die beiden PHD1-3-Varianten PHD1-3 und  $\Delta$ PHD1-3 wurden vollständig in einer PCR aus cDNA amplifiziert, wobei der FW-Primer hier eine XmaI-Schnittstelle aufweist, während der RV-Primer ebenfalls eine XhoI-Sequenz enthält. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Ligation in die beiden modifizierten Expressionsvektoren.

Zusätzlich wurde neben dem gesamten CYP33 (AS 1-301) auch nur die CYP33 RRM-Domäne (AS 2-82) mittels PCR aus cDNA amplifiziert, verdaut und in die modifizierten Expressionsvektoren ligiert. Als Schnittstellen wurden erneut BamHI und XhoI verwendet.

### **TRANSFORMATION**

Die oben beschriebenen pGADT7-Konstrukte wurden in den Hefestamm Y187 und die pGBKT7-Plasmide in den Hefestamm AH109 transformiert (vgl. Kapitel 6.2.2.1).

### **MATING-ERGEBNISSE**

Alle *Mating*-Experimente wurden entsprechend Kapitel 6.2.2.2 in Triplikaten und zusätzlich invers durchgeführt; das bedeutet die Untersuchung jedes möglichen Interaktionspartners sowohl im pGADT7- als auch im pGBKT7-Vektor.

Zuerst wurden die 4 PHD3-Varianten auf ihre Fähigkeit untersucht, mit sich selbst bzw. mit anderen PHD3-Modifikationen zu dimerisieren. Außerdem wurde die Bindungskapazität an CYP33 bzw. dessen RRM-Domäne getestet.

Das Resultat zeigt, dass die PHD3-0-Variante die beste Dimerisierungsfähigkeit mit sich selbst und mit anderen PHD3-Varianten aufweist. Es folgen die beiden Modifikationen PHD3-11 und PHD3-14. Während die Variante PHD3-3 im Vergleich eine wesentlich schwächere Fähigkeit zur Homodimerisierung zeigt, ist diese allein in der Lage, CYP33 bzw. dessen RRM-Domäne zu binden. Für die 3 anderen PHD3-Varianten konnte weder eine Bindung an CYP33 noch an dessen RRM-Domäne nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4-4).

A		pGADT7-x in Y187											
		PHD3-0		PHD3-3		PHD3-11		PHD3-14		CYP33		RRM	
pGBKT7-x in AH109	PHD3-0												
	PHD3-3												
	PHD3-11												
	PHD3-14												
	CYP33												
	RRM												
	Medium	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

B	PHD3-0	PHD3-3	PHD3-11	PHD3-14	CYP33	RRM
PHD3-0	+++	+++	+++	+++	-	-
PHD3-3	+++	+	+	+	+++	++
PHD3-11	+++	+	++	++	-	-
PHD3-14	+++	+	++	++	-	-
CYP33	-	+++	-	-		
RRM	-	++	-	-		

**Abbildung 4-4: Y2H-Mating - PHD3 x PHD3 und CYP33**

Die Abbildung 4-4 zeigt die Ergebnisse der Y2H-Mating-Ergebnisse mit den 4 PHD3-Varianten und CYP33 sowie dessen RRM-Domäne. **A)** In der Tabelle ist das Wachstum der diploiden Hefezellen auf den selektiven 2xDO- bzw. 4xDO-Medien nach dem *Mating* zu sehen. **B)** Das Wachstum der diploiden Hefezellen auf 4xDO-Medium wird von leichtem Wachstum mit „+“ bis zu starkem Wachstum mit „+++“ gekennzeichnet. Eine Bewertung mit „-“ bedeutet kein Wachstum.

Anschließend wurde die gesamte PHD1-3-Domäne sowie deren verkürzte Version  $\Delta$ PHD1-3 analysiert. Neben der Fähigkeit, die 4 PHD3-Varianten zu binden, wurde die Dimerisierungsfähigkeit sowie die Bindung an CYP33 bzw. dessen RRM-Domäne untersucht.

Beide PHD1-3-Varianten zeigten keine relevanten Unterschiede bei der Bindung der 4 PHD3-Varianten sowie der Bindung an CYP33. Allerdings war die Fähigkeit an die RRM-Domäne zu binden bei der  $\Delta$ PHD1-3-Variante reduziert. Außerdem konnte diese mit keiner der beiden PHD1-3-Varianten dimerisieren.

**A**

		pGADT7-x in Y187							
		PHD3-0		PHD3-3		PHD3-11		PHD3-14	
pGBKT7-x in AH109	PHD1-3								
	$\Delta$ PHD1-3								
	Medium	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

		pGADT7-x in Y187							
		CYP33		RRM		PHD1-3		$\Delta$ PHD1-3	
pGBKT7-x in AH109	PHD1-3								
	$\Delta$ PHD1-3								
	Medium	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

**B**

	PHD3-0	PHD3-3	PHD3-11	PHD3-14
PHD1-3	++	++	++	++
$\Delta$ PHD1-3	++	++	++	++

	CYP33	RRM	PHD1-3	$\Delta$ PHD1-3
PHD1-3	++	+	(+)	(+)
$\Delta$ PHD1-3	++	(+)	-	-

**Abbildung 4-5: Y2H-Mating - PHD1-3 x PHD3, PHD1-3 und CYP33**

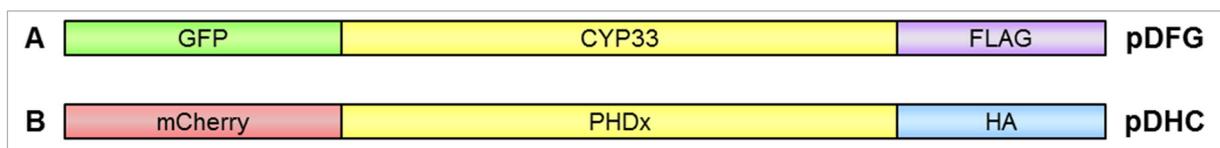
Die Abbildung 4-5 zeigt die Ergebnisse der Y2H-Mating-Ergebnisse mit den beiden PHD1-3-Varianten, den 4 PHD3-Varianten und CYP33 sowie dessen RRM-Domäne. **A)** In der Tabelle ist das Wachstum der diploiden Hefezellen auf den selektiven 2xDO- bzw. 4xDO-Medien nach dem *Mating* zu sehen. **B)** Das Wachstum der diploiden Hefezellen auf 4xDO-Medium wird von leichtem Wachstum mit „+“ bis zu starkem Wachstum mit „+++“ gekennzeichnet. Eine Bewertung mit „-“ bedeutet kein Wachstum, während die Beurteilung mit „(+“ ein extrem geringes Wachstum bedeutet.

#### 4.2.5 CoIP-EXPERIMENTE MIT PHD3, PHD1-3 UND CYP33

Zur Bestätigung der in den Y2H-Untersuchungen gefundenen Interaktionen zwischen CYP33 bzw. der CYP33 RRM-Domäne mit den 4 PHD3-Varianten und den beiden PHD1-3-Varianten wurden Koimmunpräzipitations (CoIP)-Experimente durchgeführt (vgl. Kapitel 6.2.3.4). Diese folgten auf eine vorangegangene PEI-Kotransfektion von HEK293T-Zellen mit CYP33 oder CYP33 RRM und mit einem PHD-Konstrukt entsprechend 6.2.3.1 und der Herstellung von Zelllysaten entsprechend 6.2.3.3. Anschließend wurden die Proben auf 10%ige SDS-Gele aufgetragen und mittels Western Blot detektiert.

#### KLONIERUNG

Alle für die Y2H-Experimente verwendeten Konstrukte wurden umkloniert in modifizierte pcDNA-Vektoren mit einem roten bzw. grünen Fluoreszenzmarker (mCherry oder GFP) und entweder FLAG®- oder HA-Tag. Nach der Modifizierung der MCS (vgl. Kapitel 6.1.10.2) wurde der jeweilige Fluoreszenzmarker über ClaI und HindIII sowie der FLAG®- bzw. HA-tag mittels EcoRV und KpnI eingebaut. Das CYP33 sowie dessen RRM-Domäne wurden über BamHI und XhoI in den modifizierten pcDNA-Vektor mit GFP und FLAG®-tag (pDFG) kloniert. Der veränderte pcDNA-Vektor mit mCherry und HA-tag (pDHC) wurde für die 4 PHD3- und die beiden PHD1-3-Varianten verwendet, wobei die Klonierung mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI erfolgte.



#### Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der aus pDFG und pDHC gebildeten Proteine

Durch die modifizierten pcDNA-Vektoren entstehen nach der Transfektion Proteine mit Fluoreszenzmarker und einer Markierung, die eine CoIP sowie die einfache Detektion im Western Blot erlaubt. **A)** Das gesamte CYP33 sowie dessen RRM-Domäne zeigen grüne Fluoreszenz und sind mittels FLAG®-tag detektierbar. **B)** Die 4 PHD3- und die beiden PHD1-3-Varianten zeigen rote Fluoreszenz und sind über den HA-tag detektierbar.

---

## CoIP, SDS-GELE UND WESTERN BLOTS

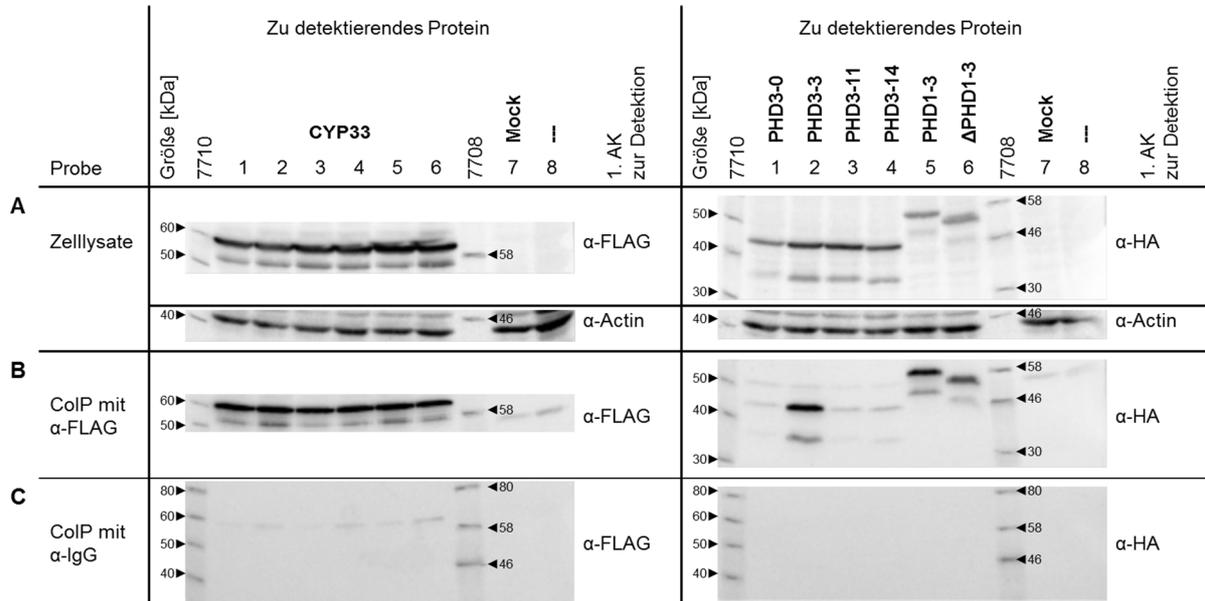
Die CoIP wurde gemäß der Vorschrift in Kapitel 6.2.3.4 durchgeführt. Als Antikörper wurde neben dem Anti-FLAG® ein Anti-IgG als Negativkontrolle verwendet. Die Proben wurden auf 10%ige SDS-Gele aufgetragen und die anschließenden Western Blots zeigten die in Abbildung 4-7 dargestellten Ergebnisse. Die Membranen mit den Zellysatsproben wurden nach der ersten Detektion gestrippt und nach der Inkubation mit dem Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper erneut entwickelt.

In dem Teil I der Abbildung 4-7 sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Interaktion des gesamten CYP33 mit den 4 PHD3-Varianten und den beiden PHD1-3-Varianten dargestellt. Die Expression der transfizierten Plasmide (CYP33: 63,4 kDa; PHD3-0: 46,5 kDa; PHD3-3: 46,3 kDa; PHD3-11: 45,2 kDa; PHD3-14: 44,9 kDa; PHD1-3: 60,2 kDa;  $\Delta$ PHD1-3: 56,2 kDa) wurde durch das Auftragen der Zellysate kontrolliert (I-A). Die Eluate der CoIP (I-B), bei der CYP33 mittels FLAG-Tag aus den Zellysaten isoliert wurde, zeigen die alleinige Interaktion von CYP33 mit der PHD3-3-Variante. Für keine der anderen 3 PHD3-Varianten konnte eine Interaktion mit CYP33 nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der gesamten PHD1-3-Domäne sowie der verkürzten Version  $\Delta$ PHD1-3, die beide auch als PHD3-3-Variante vorlagen, konnten Wechselwirkungen mit CYP33 bestätigt werden. Allerdings sind diese bei der verkürzten Version schwächer ausgeprägt als bei der gesamten PHD1-3-Domäne.

Der Abschnitt II der Abbildung 4-7 veranschaulicht die Resultate der Versuche zur Interaktion der CYP33 RRM-Domäne mit den 4 PHD3-Varianten sowie den beiden PHD1-3-Varianten. Wie oben beschrieben wurde die Expression der transfizierten Plasmide (CYP33 RRM: 39,1 kDa; PHD-Konstrukte: s. o.) überprüft (II-A). Analog zu den Ergebnissen mit dem gesamten CYP33 kann ausschließlich die PHD3-3-Variante an die CYP33 RRM-Domäne binden. Erneut kann für die weiteren 3 PHD3-3-Varianten keine Interaktion nachgewiesen werden. Gleichmaßen resultieren die CoIP-Untersuchungen der  $\Delta$ PHD1-3-Variante in keiner Interaktion mit der CYP33 RRM-Domäne, während die unveränderte PHD1-3-Domäne eine schwache Interaktion mit dem CYP33 RRM-Motiv erkennen lässt.

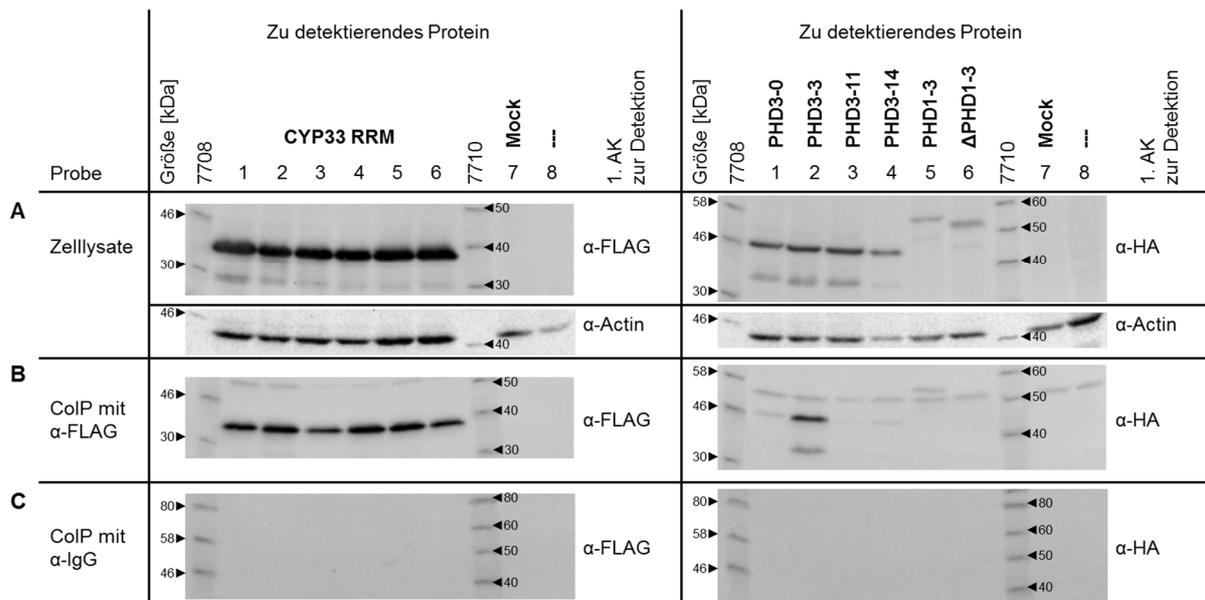
I) CYP33

Vektor	Tag	Fluoreszenz- marker	1	2	3	4	5	6	7	8
pDFG	FLAG	GFP	CYP33	CYP33	CYP33	CYP33	CYP33	CYP33	Leer	Untransfiziert
pDHC	HA	mCherry	PHD3-0	PHD3-3	PHD3-11	PHD3-14	PHD1-3	ΔPHD1-3	Leer	Untransfiziert



II) CYP33 RRM

Vektor	Tag	Fluoreszenz- marker	1	2	3	4	5	6	7	8
pDFG	FLAG	GFP	CYP33 RRM	Leer	Untransfiziert					
pDHC	HA	mCherry	PHD3-0	PHD3-3	PHD3-11	PHD3-14	PHD1-3	ΔPHD1-3	Leer	Untransfiziert



### Abbildung 4-7: CoIP - CYP33 und CYP33 RRM mit PHD3 und PHD1-3

Die Ergebnisse der CoIP-Experimente zur Bestätigung der Interaktionen zwischen CYP33 (I) bzw. dessen RRM-Domäne (II) mit den 4 PHD3-Varianten und den beiden PHD1-3-Varianten sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Die Tabelle im jeweiligen oberen Teil gibt Auskunft über die in HEK293T-Zellen transfizierten Konstrukte. Für die Nummern 1-6 wurden entweder das gesamte CYP33 (I) oder CYP33 RRM (II) im pDFG-Vektor zusammen mit jeweils einem der 6 PHD-Konstrukte im pDHC-Vektor kointransfiziert. Bei der Nummer 7 wurden die Leervektoren pDFG und pDHC (Mock) verwendet, während die Zellen für die Nummer 8 nicht transfiziert wurden. Die Tabelle im jeweiligen unteren Teil zeigt die Ergebnisse der Western Blots. In der oberen Zeile sind mit den Nummern 1-8 die verwendeten Konstrukte gemeint, während 7708 und 7710 für die verwendeten Marker stehen. Die kleinen Zahlen mit Pfeilen im Bild geben die Größen der Markerbanden in kDa an. Der 1.AK zur Detektion gibt an, in welchem Antikörper die Membran nach dem Blotten inkubiert wurde. **A)** Oben: Zur Expressionskontrolle der transfizierten Konstrukte wurden die Zellysate aufgetragen. Unten:  $\beta$ -Aktin-Kontrolle nach Strippen der Membranen und erneuter Inkubation mit dem Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper. **B)** Aufgetragen wurden die Eluate nach der CoIP mit dem Anti-FLAG-Antikörper. Das CYP33 bzw. die CYP33 RRM-Domäne (links) sollte immer sichtbar sein, während die PHD-Konstrukte (rechts) nur bei Interaktion mit dem CYP33 bzw. der CYP33 RRM-Domäne Banden zeigen. **C)** Aufgetragen wurden die Eluate nach CoIP mit dem Anti-IgG-Antikörper. Hier sind keine Banden zu sehen, da keine unspezifischen Bindungen vorhanden sind.

## 4.3 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES AF4- UND AF4•MLL-MPC

### 4.3.1 Y2H-EXPERIMENTE

#### KLONIERUNG

Alle verwendeten Konstrukte wurden entweder in voller Länge oder als Fragmente in Abhängigkeit der Lage vorkommender Domänen in die beiden modifizierten Y2H-Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Für alle Klonierungen wurden die Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und XhoI entsprechend der Tabelle 4-3 für das Flankieren des jeweiligen N-terminalen (5') bzw. C-terminalen Endes (3') verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte entweder direkt aus bereits im Arbeitskreis vorhandenen Plasmiden, die freundlicherweise von Dr. Bastian Scholz bereitgestellt wurden, oder nach Amplifizierung mittels PCR-Reaktion aus cDNA. Anschließend wurden alle Konstrukte in die beiden modifizierten Expressionsvektoren ligiert.

#### TRANSFORMATION

Die oben beschriebenen pGADT7-Konstrukte wurden in den Hefestamm Y187 und die pGBKT7-Plasmide in den Hefestamm AH109 transformiert (vgl. 6.2.2.1).

Tabelle 4-3: Reporter Gene und ihre Merkmale

Reporter	AS	bp	Charakteristische Domänen im Protein	5'	3'
AF4N	2-346	4-1038		BamHI	XhoI
AF4 1-50	2-58	4-174		BamHI	EcoRI
AF4 1-100	2-111	4-333		BamHI	EcoRI
AF4 1-150	2-150	4-450		BamHI	EcoRI
AF4 1-200	2-206	4-618		BamHI	EcoRI
AF5-1	1-505	1-1515	Phosphorylierungsstellen, Serinreich	BamHI	XhoI
AF5-2	442-806	1324-2418	Phosphorylierungsstellen	BamHI	XhoI
AF5-3	795-1164	2383-3492	Serinreich, RING	BamHI	XhoI
BRD4	1-699	1-2097		BamHI	XhoI
BZLF1	1-245	1-735	AD (N-terminal), Phosphorylierungsstelle, DNA-BD, Doppelwendeldomäne, AD (C-terminal)	BamHI	XhoI
CCNT1	1-727	1-2181	s.u.	BamHI	EcoRI
CCNT1-1	1-220	1-660	CCL1-Region, Cyclinbox-Faltung, CDK9-Interface	BamHI	EcoRI
CCNT1-2	187-401	559-1203	Teil der CCL1-Region	BamHI	EcoRI
CDK9	1-372	1-1119	s.u.	BamHI	XhoI
CDK9-1	1-100	1-300	Zentrale ATP-Bindestelle, CDK9/Cyclin-Interface	BamHI	XhoI
CDK9-2	70-250	210-750	Aktivierungsschleife, Substratbindestelle, Kinase-aktive Stelle	BamHI	XhoI
CDK9-3	220-372	661-1119	NLS, C-terminale Domäne	BamHI	XhoI
DOT1L-1	2-422	4-1266	HMTase katalytische Domäne, AT-Haken	BamHI	XhoI
DOT1L-2	387-642	1159-1926	Apolipoporphin-III-Faltung, NLS, AT-Haken, Leucin-Zipper	BamHI	XhoI
DOT1L-3	612-972	1834-2916		BamHI	XhoI
DOT1L-4	934-1275	2800-3825		BamHI	XhoI
E6/E7	1-254	1-764	Zn-Bindedomänen	BamHI	XhoI
IE1	1-491	1-1473		BamHI	XhoI
NPM1	1-295	1-885	s.u.	BamHI	XhoI
NPM1-1	1-121	1-363	Oligomerisationsdomäne, NES	BamHI	XhoI
NPM1-2	91-201	271-603	Saure Domänen, NLS, ASP-reich	BamHI	XhoI
NPM1-3	169-295	505-885	RNA-BD, ATP-Bindestelle	BamHI	XhoI
NSD1-1	1-254	1-762		BamHI	XhoI
NSD1-2	216-569	646-1707		BamHI	EcoRI
NSD1-3	533-869	1597-2607		EcoRI	EcoRI

NSD1-4	833-1175	2497-3525		XhoI	XhoI
NSD1-6	1432-1870	4294-5610		BamHI	EcoRI
NSD1-7	1829-2240	5485-6720		BamHI	XhoI
NSD1-8	2199-2695	6595-8085		BamHI	XhoI
RELA-1	1-203	1-609	RHD, DNA-Bindemotiv	BamHI	XhoI
RELA-2	159-310	475-930	IPT-Domäne	BamHI	XhoI

### **MATING-ERGEBNISSE**

Alle *Mating*-Experimente wurden entsprechend Kapitel 6.2.2.2 in Triplikaten und zusätzlich invers durchgeführt; das bedeutet die Untersuchung jedes möglichen Interaktionspartners sowohl im pGADT7- als auch im pGBKT7-Vektor.

Die in Tabelle 4-3 beschriebenen Konstrukte wurden alle gegeneinander getestet. Da bei diesen Experimenten über 1.000 Interaktionen getestet wurden, werden nur die Resultate bildlich gezeigt und erläutert, bei denen Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen aufgrund des Wachstums auf 4xDO-Agarplatten erkennbar waren. Wird die Interaktion zwischen zwei der oben genannten Konstrukte nicht erwähnt, zeigten diese nach dem *Mating* kein Wachstum auf den 4xDO-Agarplatten.

Ausgenommen sind hiervon die Experimente mit den Konstrukten AF4 1-100, AF4 1-150, AF4 1-200, BZLF1, NSD1-1, NSD1-2 sowie NSD1-4. Bei diesen Konstrukten war bei fast allen getesteten Interaktionspartnern ein Wachstum auf den 4xDO-Agarplatten visuell erkennbar. Diese Beobachtungen deuten auf möglicherweise unspezifische Bindungen hin. Daraus resultiert ein Wachstum der diploiden Hefezellen auf den 4xDO-Agarplatten.

Des Weiteren werden keine Ergebnisse für die Konstrukte AF5-3, NPM1, NPM1-2 und NPM1-3 gezeigt, weil nach dem *Mating* kein Wachstum auf den 4xDO-Agarplatten erkennbar war und deswegen keine Interaktionen detektiert wurden.

AF4N																			
AF4 1-50		CCNT1		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9-3		DOT1L-3		RELA-2							
++		+++		+		++		+		++		+							
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

AF4 1-50																			
AF4N		AF4 1-50		AF4 1-100		AF4 1-150		AF5-1		BRD4		CCNT1		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9-1	
++		++		++		++		+		+		++		+		++		+	
CDK9-3		DOT1L-3		DOT1L-4		E6/E7		NSD1-3		RELA-1		RELA-2							
+		+++		++		++		++		++		+++							
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

AF5-1										AF5-2					BRD4				
AF4 1-50		CCNT1				RELA-1				AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		NPM1-1			
+		+++				(+)				+		(+)		+		+			
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

CCNT1																			
AF4N		AF4 1-50		AF4 1-100		AF4 1-150		AF4 1-200		AF5-1		BRD4		BZLF1		CCNT1		CCNT1-1	
+++		++		+++		+++		++		+++		(+)		++		+		++	
CCNT1-2		CDK9		CDK9-1		CDK9-3		DOT1L-3		DOT1L-4		E6/E7		IE1		NSD1-2		NSD1-6	
++		+++		+++		++		++		(+)		+++		++		+++		+	
RELA-2																			
++																			
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

CCNT1-1																			
AF4N		AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		DOT1L-4		E6/E7		NSD1-3		RELA-1					
+		+		++		+		(+)		+		+		++					
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

CCNT1-2																			
AF4N		AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		E6/E7		IE1		NSD1-3		RELA-1					
++		++		++		+		++		+		(+)		++					
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

CDK9																					
AF4 1-50		CCNT1		E6/E7		RELA-1															
+		+++		(+) (+)		(+) (+)															
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

CDK9-1												CDK9-2																			
AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		E6/E7		NSD1-3		RELA-1				RELA-1																	
+		+++		+		(+) (+)		(+) (+)		++				(+) (+)																	
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO		

CDK9-3																															
AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		E6/E7		NSD1-3		RELA-1																					
+		++		+		++		+		++																					
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

DOT1L-1				DOT1L-2				DOT1L-4																							
RELA-1				DOT1L-2		RELA-1				AF4 1-50		CCNT1		CCNT1-1		DOT1L-3															
(+) (+)				++		(+) (+)				++		(+) (+)		(+) (+)		+															
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

DOT1L-3																																							
AF4N		AF4 1-50		BRD4		CCNT1		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9-1		CDK9-3		DOT1L-3		DOT1L-4																					
++		+++		+		++		+		+		+		+		++		++		+		+		++		+		++		++		+		+					
E6/E7		NPM1-1		NSD1-3		RELA-1		RELA-2																															
++		+		++		++		+																															
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO						

E6/E7																																							
AF4 1-50		CCNT1		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9		CDK9-1		CDK9-3		DOT1L-3		IE1		RELA-1																					
++		+++		+		++		(+) (+)		(+) (+)		++		++		+		(+) (+)																					
RELA-2																																							
++																																							
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO						

IE1										NPM1-1																					
CCNT1		CCNT1-2		E6/E7		RELA-1				BRD4		DOT1L-3																			
++		+		+		(+) (+)				+		+																			
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

NSD1-3														NSD1-6					
AF4 1-50		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9-1		CDK9-3		DOT1L-3		RELA-1				CCNT1		RELA-1	
++		+		(+) (+)		(+) (+)		+		++		(+) (+)				+		(+) (+)	
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

RELA-1																			
AF4 1-50		AF4 1-100		AF4 1-150		AF4 1-200		AF5-2		BZLF1		CCNT1-1		CCNT1-2		CDK9		CDK9-1	
++		+		(+) (+)		(+) (+)		(+) (+)		+		++		++		(+) (+)		++	
CDK9-2		CDK9-3		DOT1L-1		DOT1L-2		DOT1L-3		E6/E7		IE1		NSD1-1		NSD1-2		NSD1-3	
(+) (+)		++		(+) (+)		(+) (+)		++		(+) (+)		(+) (+)		(+) (+)		+		(+) (+)	
NSD1-4		NSD1-6		RELA-2															
+		(+) (+)		++															
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

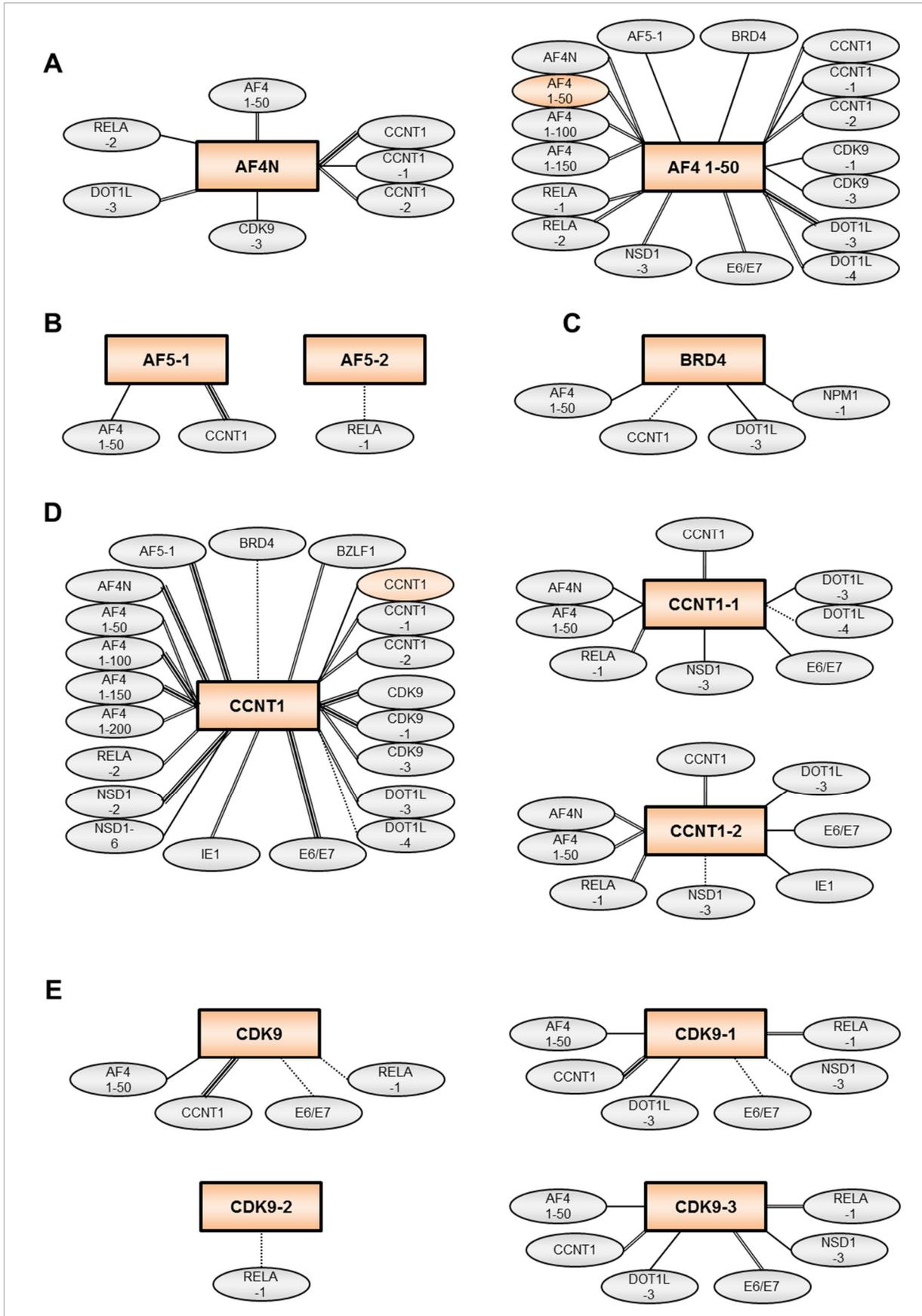
RELA-2																			
AF4N		AF4 1-50		CCNT1		DOT1L-3		E6/E7		RELA-1									
+		+++		++		+		++		++									
2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO	2xDO	4xDO

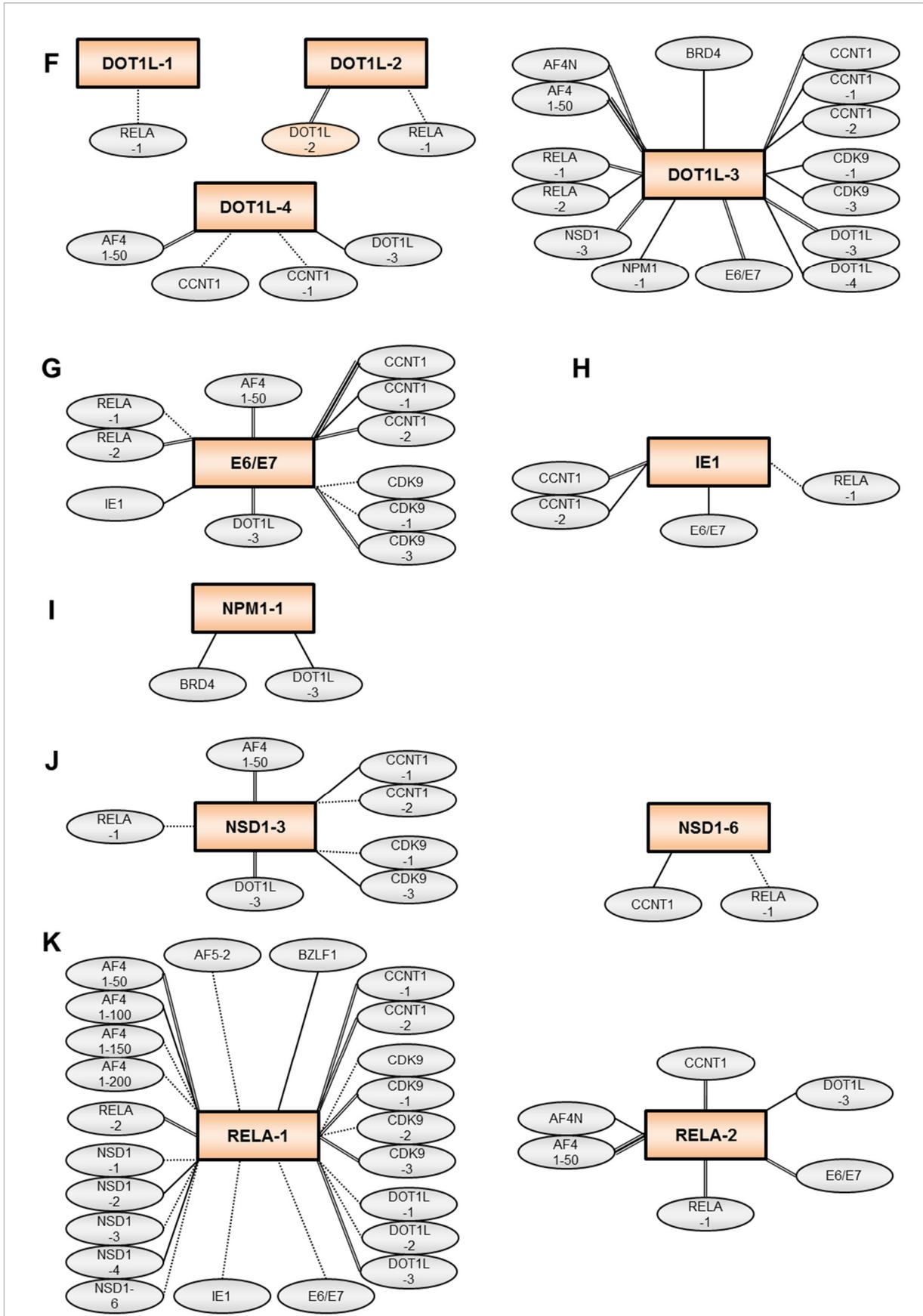
#### Abbildung 4-8: Ergebnisse des Y2H-Mating mit Proteinen des AF4 und AF4-MLL-MPC

Die Abbildung 4-8 zeigt die Ergebnisse der Y2H-Mating-Experimente mit den in Tabelle 4-3 vorgestellten Konstrukten. Das in der jeweils obersten grau unterlegten Zeile angegebene Konstrukt stellt das gegen alle anderen getestete Konstrukt dar. In der Zeile darunter werden die Konstrukte angegeben, bei denen eine Interaktion mit diesem aufgrund des Wachstums der diploiden Hefezellen auf 4xDO-Medium visuell erkennbar war. Die dritte Zeile illustriert das Wachstum der diploiden Hefezellen auf den selektiven 2xDO- (links) bzw. 4xDO-Medien (rechts) nach dem *Mating*. Schließlich wird in der folgenden Zeile das Wachstum auf dem 4xDO-Medium von extrem geringem Wachstum mit „(+)" bis zu starkem Wachstum mit „+++“ gekennzeichnet. Wenn ein Konstrukt nicht als Interaktionspartner erwähnt wird, konnte bei diesen beiden kein Wachstum auf dem 4xDO-Medium und damit keine Wechselwirkung festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Experimente mit den Konstrukten AF4 1-100, AF4 1-150, AF4 1-200, BZLF1, NSD1-1, NSD1-2 sowie NSD1-4 werden nicht gezeigt, weil bei fast allen möglichen Interaktionspartnern Wachstum auf dem selektiven 4xDO-Medium visuell erkennbar war. Diese Beobachtung deutet auf möglicherweise unspezifische Bindungen und damit falsch-positive Interaktionen hin.

Für AF5-3, NPM1, NPM1-2 und NPM1-3 werden keine Ergebnisse der Y2H-Experimente dargestellt, weil für diese Konstrukte keine Interaktionen detektiert werden konnten.





**Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der in Abbildung 4-8 gezeigten Interaktionen**

Die Abbildung 4-9 veranschaulicht die beim Y2H-Mating mit den Proteinen des AF4- bzw. AF4·MLL-MPC detektierten Interaktionen. Die Art der Linie, die das getestete Protein jeweils in der Mitte (orange) mit den gefundenen Interaktionspartnern (grau) verbindet, symbolisiert die Stärke der Wechselwirkung.

Linie 3fach: Starke Interaktion (+++); Linie 2fach: Mittelstarke Interaktion (++); Einzelne Linie: Leichte Interaktion (+); Gepunktete Linie: Fast keine Interaktion ((+))

**AF4**

Die Interaktionen des Proteins AF4 werden in Abbildung 4-9 A dargestellt. Das Fragment AF4N zeigt eine starke Wechselwirkung zum gesamten CCNT1, eine leichte zu dessen Fragment 1 (CCTN1-1) sowie eine mittelstarke zu dessen Fragment 2 (CCNT1-2). Außerdem wurden mittelstarke Interaktionen mit den Fragmenten AF4 1-50 und DOT1L-3 sowie leichte Wechselwirkungen mit CDK9-3 und RELA-2 festgestellt. Für das Konstrukt AF4 1-50 wurde eine sehr starke Interaktion mit DOT1L-3 sowie starke Wechselwirkungen mit AF4N, AF4 1-100, AF4 1-150, CCNT1, CCNT1-2, DOT1L-4, E6/E7, NSD1-3, RELA-1 und RELA-2 gefunden. Des Weiteren wurden leichte Interaktionen mit AF5-1, BRD4, CCNT1-1, CDK9-1 und CDK9-3 detektiert. Weiterhin zeigte das Fragment AF4 1-50 die Fähigkeit zur Homodimerisierung. Die Ergebnisse für die Fragmente AF4 1-100, 1-150 und 1-200 werden nicht näher erläutert, da für fast jeden möglichen Interaktionspartner Wechselwirkungen festgestellt wurden. Diese Beobachtungen deuten auf unspezifische Bindungen hin und damit auf falsch-positive Ergebnisse.

**AF5**

Die Wechselwirkungen des Proteins AF5 veranschaulicht Abbildung 4-9 B. Während das Fragment 1 (AF5-1) eine starke Interaktion zu CCNT1 sowie eine leichte zu AF4 1-50 zeigt, wurde für das Fragment 2 (AF5-2) nur eine extrem schwache Wechselwirkung zu RELA-1 detektiert. Für das Fragment 3 (AF5-3) konnte keine Interaktion detektiert werden.

**BRD4**

Die Abbildung 4-9 C illustriert die leichte Interaktion von BRD4 mit AF4 1-50, DOT1L-3 und NPM1-1. Zusätzlich konnte eine sehr schwache Wechselwirkung mit CCNT1 detektiert werden.

## CCNT1

Die identifizierten Interaktionen des Proteins CCNT1 demonstriert Abbildung 4-9 D. Diese verdeutlicht starke Interaktionen mit AF4N, AF4 1-100, AF4 1-150, AF5-1, CDK9, CDK9-1, E6/E7 und NSD1-2 sowie mittelstarke Wechselwirkungen mit AF4 1-50, AF4 1-200, BZLF1, CCNT1-1, CCNT1-2, CDK9-3, DOT1L-3, IE1 und RELA-2. Neben der leichten Bindung an NSD1-6 konnten auch sehr schwache Interaktionen mit BRD4 und DOT1L-4 identifiziert werden. Außerdem wurde die Fähigkeit zur Homodimerisierung gezeigt. Für das Fragment 1 (CCNT1-1) konnten neben starken Interaktionen mit CCNT1 und RELA-1 leichte Wechselwirkungen mit AF4N, AF4 1-50, DOT1L-3, E6/E7 und NSD1-3 sowie eine sehr schwache Bindung an DOT1L-4 detektiert werden. Ähnlich sehen die Ergebnisse für das Fragment 2 (CCNT1-2) aus. Die Interaktionen mit AF4N und AF4 1-50 sind stärker, aber mit CCNT1, DOT1L-3, E6/E7 und RELA-1 vergleichbar und mit NSD1-3 schwächer. Anstelle des DOT1L-4 wurde IE1 als leichter Interaktionspartner identifiziert.

## CDK9

In Abbildung 4-9 E werden die Wechselwirkungen des Proteins CDK9 verbildlicht. Neben einer starken Interaktion mit CCNT1 ist eine leichte Bindung an AF4 1-50 zu erkennen sowie sehr schwache Wechselwirkungen mit E6/E7 und RELA-1. Für das Fragment 1 (CDK9-1) konnten zusätzlich leichte Interaktionen mit DOT1L-3 sowie sehr schwache Wechselwirkungen mit NSD1-3 gezeigt werden. Während für das Fragment 2 (CDK9-2) nur eine sehr geringe Interaktion mit RELA-1 detektiert wurde, sind die Interaktionspartner des Fragments 3 (CDK9-3) mit denen von CDK9-1 identisch. Allerdings variiert die Stärke der Bindung bei CCNT1 (mittelstark), E6/E7 (mittelstark) und NSD1-3 (leicht).

## DOT1L

Die Interaktionen für DOT1L zeigt Abbildung 4-9 F. Für die Fragmente 1 und 2 (DOT1L-1 und DOT1L-2) wurde eine schwache Wechselwirkung mit RELA-1 detektiert. Zusätzlich zeigte DOT1L-2 die Fähigkeit zur Homodimerisierung. Das Fragment 3 (DOT1L-3) weist neben einer starken Bindung an AF4 1-50, mittelstarke Wechselwirkungen zu AF4N, CCNT1, E6/E7, NSD1-3 und RELA-1 sowie leichte Interaktionen mit BRD4, CCNT1-1, CCNT1-2, CDK9-1, CDK9-3, DOT1L-4, NPM1-1 und RELA-2 auf. Auch bei DOT1L-3 war die Fähigkeit zur Homodimerisierung zu beobachten. Für das Fragment 4 (DOT1L-4) wurde eine mittelstarke Wechselwirkung mit AF4 1-50,

eine leichte Interaktion mit DOT1L-3 sowie sehr schwache Bindungen an CCNT1 und CCNT1-1 nachgewiesen.

### **E6/E7**

Die Abbildung 4-9 G illustriert die Ergebnisse für E6/E7. Dieses Protein zeigt neben einer starken Interaktion mit CCNT1, mittelstarke Wechselwirkungen mit AF4 1-50, CCNT1-2, CDK9-3, DOT1L-3 und RELA-2, leichte Bindungen an CCNT1-1 und IE1 sowie sehr schwache Interaktionen mit CDK9, CDK9-1 und RELA-1.

### **IE1**

Die Abbildung 4-9 H zeigt für IE1 eine mittelstarke Wechselwirkung mit CCNT1, leichte Interaktionen mit CCNT1-2 und E6/E7 sowie eine sehr schwache Bindung an RELA-1.

### **NPM1**

Interaktionen des Proteins NPM1 werden in Abbildung 4-9 I vorgestellt. Allerdings zeigte nur das Fragment 1 (NPM1-1) leichte Interaktionen mit BRD4 und DOT1L-3. Deshalb werden das Protein NPM1 ebenso wie die Fragmente 2 und 3 (NPM1-2 und NPM1-3) nicht dargestellt.

### **NSD1**

Die Wechselwirkungen des Proteins NSD1 verdeutlicht Abbildung 4-9 J. Da bei den Fragmenten 1, 2 und 4 (NSD1-1, NSD1-2 und NSD1-4) bei fast jedem möglichen Interaktionspartner Wechselwirkungen detektiert wurden, werden diese wegen vermutlich unspezifischer Bindungen nicht gezeigt. Für das Fragment 3 (NSD1-3) wurden mittelstarke Interaktionen mit AF4 1-50 und DOT1L-3, leichte Wechselwirkungen mit CCNT1-1 und CDK9-3, sowie sehr schwache Bindungen an CCNT1-2, CDK9-1 und RELA-1 detektiert. Dagegen zeigte das Fragment 6 (NSD1-6) nur die leichte Interaktion mit CCNT1 und die sehr schwache Bindung an RELA-1.

**RELA**

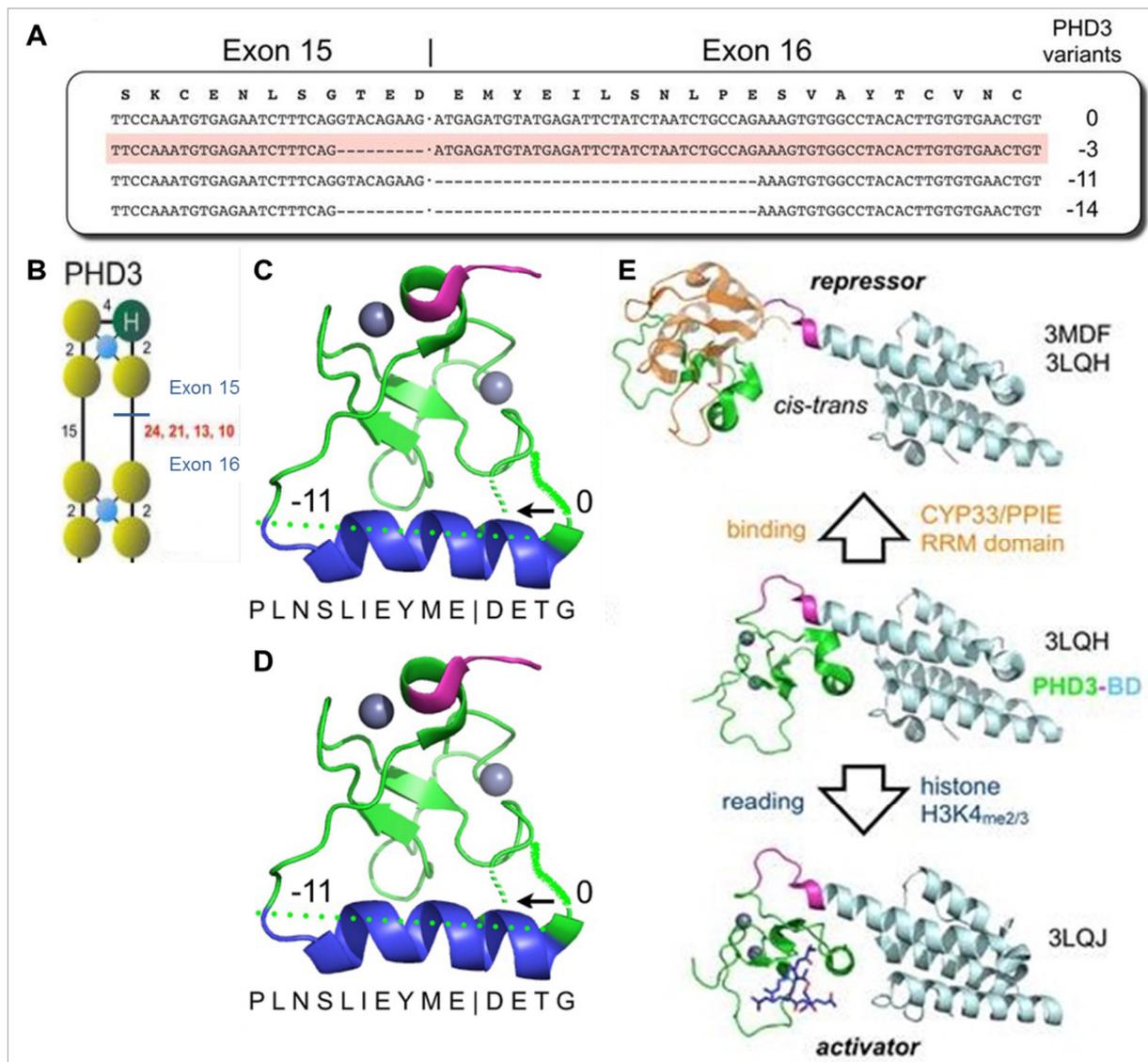
Die Abbildung 4-9 K zeigt die Ergebnisse für das Protein RELA. Für das Fragment 1 (RELA-1) wurden mittelstarke Interaktionen mit AF4 1-50, CCNT1-1, CCNT1-2, CDK9-1, DOT1L-3 und RELA-2 sowie leichte Wechselwirkungen mit AF4 1-100, BZLF1, NSD1-2 und NSD1-4 detektiert. Zusätzlich waren sehr schwache Bindungen an AF4 1-150, AF4 1-200, AF5-2, CDK9, CDK9-2, DOT1L-1, DOT1L-2, E6/E7, IE1, NSD1-1, NSD1-3 und NSD1-6 zu erkennen. Das Fragment 2 (RELA-2) zeigte eine starke Interaktion mit AF4 1-50, mittelstarke Wechselwirkungen mit CCNT1, E6/E7 und RELA-1 sowie leichte Bindungen an AF4N und DOT1L-3.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 PHD-FINGER-DOMÄNEN

#### 5.1.1 PHD3 – 4 VARIANTEN MIT UNTERSCHIEDLICHER FUNKTION?

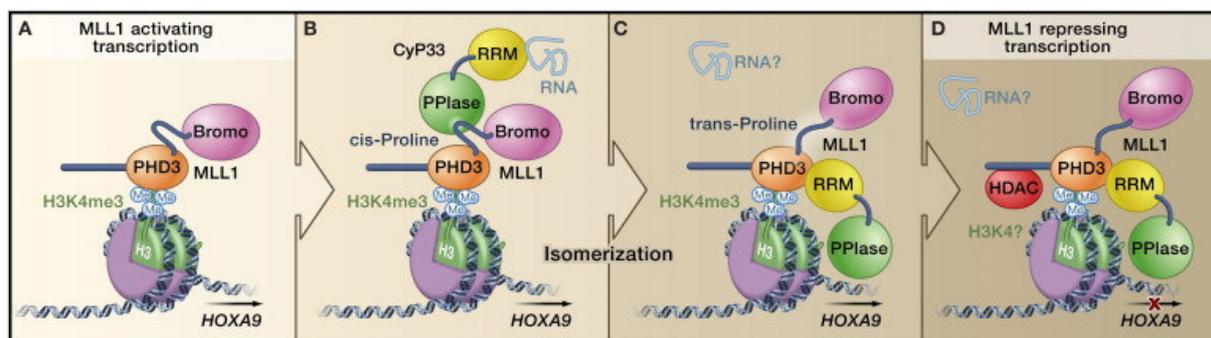
Infolge alternativer Spleißprozesse können an der Verknüpfung von MLL Exon 15 und Exon 16 verschiedene MLL-Transkripte entstehen, wodurch 4 differente PHD3-Varianten gebildet werden (vgl. Abbildung 5-1 A und B). Zusätzlich zu dem MLL Transkript voller Länge (PHD3-0) finden sich verkürzte Versionen mit 3, 11 bzw. 14 fehlenden Codons (PHD3-3, PHD3-11 und PHD3-14) [78] [94] [133]. Die Konsequenz ist eine Konformationsänderung der von MLL Exon15 und Exon 16 kodierten PHD3-Domäne, welche vor allem die dadurch verkürzte (PHD3-3) bzw. vollständig fehlende (PHD3-11 und PHD3-14)  $\alpha$ -Helix der PHD3-Domäne betrifft (vgl. Abbildung 5-1 C und D). Diese ist relevant für Protein-Protein-Interaktionen mit der benachbarten BD-Domäne, weshalb die Bindung an CYP33 sowie die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen beeinflusst wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass alle 4 PHD3-Varianten in verschiedenen Zelllinien annähernd gleich transkribiert werden. Insofern scheint deren relative Präsenz in differenten Geweben vergleichbar zu sein. Die bisher unveröffentlichten Arbeiten an den PHD3-Varianten 0 und -3 der Arbeitsgruppe um Manuel O. Diaz (*Oncology Research Institute, Loyola University Chicago Stritch School of Medicine*) zeigen ähnliche Resultate. Jedoch kann nur die PHD3-3-Variante an CYP33 sowie dessen RRM-Domäne binden. Interessanterweise wurde genau diese PHD3-Variante mit der BD- oder RRM-Domäne sowie mit H3K4<sub>me</sub>-Signaturen kokristallisiert [83] [125]. Allerdings weist die PHD3-3-Form im Vergleich zu den restlichen 3 Varianten eine schwächere Fähigkeit zur Homodimerisierung auf, weshalb die Vermutung der bevorzugten Interaktion mit den anderen nicht an CYP33 bindenden PHD3-Varianten naheliegt. Konträr dazu wurde für die PHD3-0-Variante die stärkste Fähigkeit zur Homodimerisierung detektiert. Resultierend scheint eine Dimerisierung des MLL Proteins nur favorisiert bei alternativem Spleißen des PHD3. Zusätzlich ist die Länge der PHD3  $\alpha$ -Helix relevant für die Homodimerisierung, weil deren Verkürzung bzw. Absenz mit einer reduzierten Fähigkeit zur Dimerisierung einhergeht.



**Abbildung 5-1: MLL PHD3-Varianten und ihre Funktionen I**

Die nach [121] modifizierte Abbildung 5-1 veranschaulicht die durch alternative Spleißprozesse an der Verknüpfung von MLL Exon 15 und Exon 16 entstehenden 4 verschiedenen PHD3-Finger sowie die resultierende Konsequenz für das MLL-Protein. **A**) Darstellung der AS-Sequenz (Zeile 1) sowie der 4 verschiedenen Abfolgen der Nukleinbasen (Zeile 2-5). Die Zahlen in der rechten Spalte stehen für die Anzahl der jeweils fehlenden AS und benennen die 4 verschiedenen PHD3-Varianten. **B**) PHD3-Struktur. Die gelben Kreise bedeuten Cysteine, während der grüne Kreis für ein Histidin steht; die Zahlen geben die Anzahl der AS dazwischen an; die kleinen blauen Kreise sind Zinkionen, welche die Struktur der PHD-Finger koordinieren; der dunkelblaue Balken bei den roten Zahlen zeigt die MLL Exon 15/16-Verknüpfung an und veranschaulicht die Stelle fehlender AS. **C**) Proteinstruktur der PHD3-0-Variante. Die blaue helikale Struktur, welche für den Kontakt zur BD-Domäne relevant ist, wird durch alternatives Spleißen modifiziert und bei der PHD3-11-Form vollständig deletiert. Pink: Linker zwischen PHD3 und BD-Domäne; Grau: Zinkionen. **D**) Proteinstruktur der PHD3-3-Variante. Erneute Deletion der blauen helikalen Struktur bei PHD3-14. **E**) Mitte: Proteinstruktur der PHD3-BD-Domäne. Grün: PHD3; Pink: Linker; Hellblau: BD-Domäne. Unten: PHD3-BD-Domäne mit Bindung einer H3K4<sub>me</sub>-Signatur an den PHD3. Dunkelblau: H3K4<sub>me</sub>. Oben: PHD3-BD-Domäne mit Bindung der CYP33 RRM-Domäne an den PHD3, weshalb die Isomerisierung des PHD3 und damit eine effiziente CYP33-Bindung ermöglicht werden. Orange: CYP33.

Das MLL Protein weist 4 PHD-Domänen auf, von denen die beste strukturelle und funktionelle Charakterisierung bisher für den PHD3-Finger vorliegt (vgl. Abbildung 5-1 B) [122], welcher für die stabile Bindung von MLL an Targetgene essentiell ist [83] und als regulatorische Plattform für die Kontrolle der transkriptionellen Regulation durch MLL dient [125]. Neben der spezifischen Erkennung [125] [126] der durch die enzymatische MLL-Aktivität gebildeten H3K4<sub>me</sub>-Signaturen [93] [103], welche von der BD-Domäne verstärkt wird [83], kann alternativ die Peptidyl-cis-trans-Isomerase CYP33 über deren RRM-Domäne gebunden werden. Aufgrund der Bindung der CYP33 RRM-Domäne an den PHD3 kommt es zu einer Isomerisierung im Linker zwischen PHD3- und BD-Domäne, wodurch eine effiziente Bindung der RRM-Domäne ermöglicht wird (vgl. Abbildung 5-1 E) [82] [83] [122] [120] [126] [127] [128]. Interessanterweise ist die BD-Domäne über die Bindung von ASB2 in die schnelle Degradierung des MLL Proteins involviert [84]. Aus der Interaktion der CYP33 RRM-Domäne mit dem PHD3 resultiert die Inhibierung der Bindung des PHD3 an H3K4<sub>m3</sub>-Signaturen. Demnach bedeutet die Isomerisierung des PHD3 einen Wechsel zwischen der Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen und der Bindung von CYP33 [83] mit unterschiedlichen Konsequenzen für die Aktivität der PHD3-Domäne (vgl. Abbildung 5-2) [126]. Die Präsenz von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen in den kodierenden Regionen transkriptionell aktiver Gene bedeutet deren Beteiligung an der Aktivierung transkriptioneller Prozesse [92] [261] [262]. Die CYP33 RRM-Domäne kann spezifisch RNA oder an den PHD3 binden [82]. Wenn RNA bindet, erhöht sich die CYP33-Isomeraseaktivität auch wenn die bindenden RNAs bis jetzt noch unbekannt sind [128] [263]. Allerdings wird diese Interaktion durch die Bindung von CYP33 an die MLL PHD3-Domäne inhibiert [83]. Daraus resultiert die Konvertierung des CYP33 vom RNA-bindenden Protein zum Mediator für Proteininteraktionen, weil die Interaktion mit inhibitorischen Proteinen des PRC1 wie z. B. BMI1, CtBP, HPC2/CBX4 und HDAC1 ermöglicht wird über die Bindung an die MLL MT-Domäne [82] [126]. Die SUMO E3-Ligase HPC2/CBX4 markiert Proteine wie z. B. CtBP für die proteasomale Degradierung [264]. Darüber hinaus kann diese auch direkt an das als Repressor für Genexpression fungierende Protein JARID1B/ KDM5B binden, welches H3K4<sub>me</sub>-Signaturen entfernt und dadurch Genlozi inaktiviert [265]. Dass CYP33 die MLL-Funktion negativ reguliert zeigt auch die reduzierte Transkription von Targetgenen des MLL. Zusätzlich reduziert CYP33 H3K4<sub>me</sub>-Signaturen ebenso wie H3-Acetylierungen in deren Promotorregionen [126].



**Abbildung 5-2: MLL als transkriptioneller Aktivator und Repressor**

Der Wechsel von MLL als transkriptioneller Aktivator zur Funktion als transkriptioneller Repressor ist in Abbildung 5-2 [266] dargestellt. **A)** Die MLL PHD3-Domäne bindet an eine H3K4<sub>me</sub>-Signatur, wodurch das MLL Protein mit der H3K4-Methylierung sowie deren Erkennung als transkriptioneller Aktivator fungiert. **B)** Die CYP33 PPlase-Domäne initiiert die Isomerisierung im Linker zwischen dem PHD3 und der BD-Domäne. **C)** Durch die Isomerisierung kann die CYP33 RRM-Domäne effizient an den PHD3 binden, wodurch die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen durch den PHD3 inhibiert wird. **D)** Im Folgenden wird die Bindung inhibitorischer Proteine des PRC1 wie z. B. HDACs an der MLL MT-Domäne ermöglicht, woraus sich für das MLL Protein die Funktion als transkriptioneller Repressor ergibt.

Die oben beschriebenen Interaktionen verdeutlichen den ambivalenten Charakter des MLL Proteins. Auf der einen Seite ist es in die transkriptionelle Aktivierung über die Bindung des PHD3 an H3K4<sub>me</sub>-Signaturen involviert [121] [126]. Demgegenüber steht die Beteiligung an der transkriptionellen Repression durch die Interaktion des PHD3 mit dem Enzym CYP33 und darüber involvierten Proteinen des PRC1. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Funktionen des MLL Proteins bietet der hier untersuchte alternative Spleißprozess des PHD3 (vgl. Abbildung 5-3). Wie oben beschrieben ist eine Interaktion des PHD3 mit dem CYP33 nur bei der PHD3-3-Variante möglich, während für die anderen 3 PHD3-Formen keine Wechselwirkung mit dem CYP33 nachweisbar ist. Aus der alleinigen Bindung der PHD3-3-Variante an das CYP33 folgt, dass die weitere Interaktion mit den inhibitorischen Proteinen des PRC1 sowie die resultierende transkriptionelle Repression gleichermaßen nur bei dieser PHD3-Form möglich sind. Allerdings ist im Folgenden das Verhalten der gesamten PHD1-3-Domäne zu beobachten, da die PRC1-Proteine über die Bindung an die strangaufwärts gelegene MT-Domäne agieren. Für die PHD3-Varianten 0, -11 und -14 gelten die ausschließliche Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen und die damit verbundene Funktion als transkriptioneller Aktivator. Diese Beobachtungen erklären auch die Resultate von Experimenten, bei denen Genexpressionsprofile von MLL-*knockout*-Zellen mit Wildtypzellen verglichen wurde. Hierbei konnte neben einer Re-

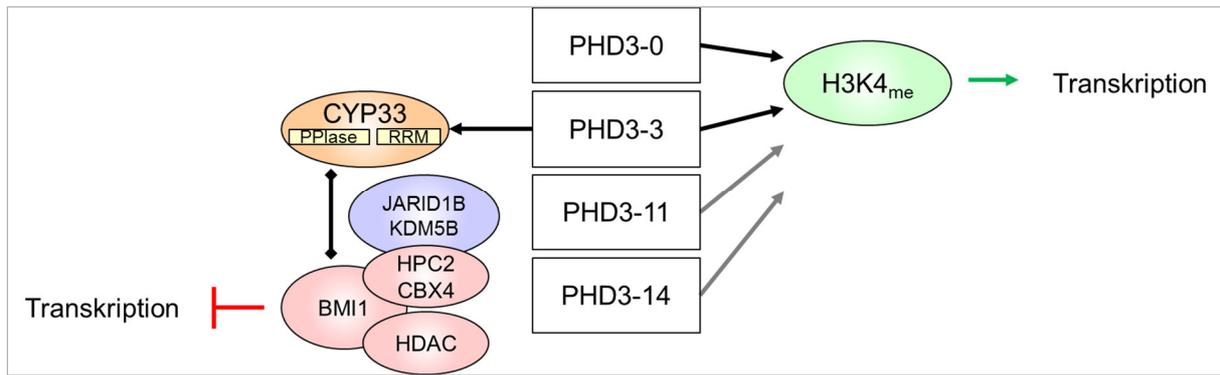
duktion der Transkription die Erhöhung der Transkription bei doppelt so vielen Genen gezeigt werden [267].

Sowohl die Y2H- als auch die CoIP-Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Interaktion der PHD3-3-Variante wesentlich stärker ist als mit der CYP33 RRM-Domäne allein. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass der PHD3 nicht ausschließlich mit der RRM-Domäne des CYP33 interagiert bzw. dass andere Teile des CYP33 für die Wechselwirkung mit dem PHD3 relevant sind. Darunter könnte u. a. die Cyclophilin-Domäne sein, welche durch ihre PPIase-Aktivität die Isomerisierung im Linker zwischen dem PHD3 und der BD-Domäne verursacht und dadurch die effiziente PHD3-Bindung an die CYP33 RRM-Domäne erlaubt [83] [266].

Die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen durch die beiden PHD3-Varianten 0 und -3 wurde bereits untersucht (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe um Manuel O. Diaz vom *Oncology Research Institute, Loyola University Chicago Stritch School of Medicine*). Für beide Versionen konnte die Bindung an H3K4<sub>me</sub>-Peptide nachgewiesen werden. Interessant wäre zu sehen, ob auch die PHD3-11- sowie die PHD3-14-Variante die Interaktion mit H3K4<sub>me</sub>-Peptiden eingehen.

Außerdem bleibt die bevorzugte Bindung der PHD3-3-Variante an CYP33 oder H3K4<sub>me</sub>-Signaturen zu analysieren. Der PHD3 besitzt distinkte Bindestellen für beide Interaktionspartner und die wechselseitige Inhibierung der Bindung des Einen durch erhöhte Level des Anderen konnte bereits nachgewiesen werden [126].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Relevanz der 4 PHD3-Varianten für die Interaktion des MLL·N- mit dem MLL·C-Fragment nach erfolgter proteolytischer Spaltung des Wildtypproteins durch die Taspase 1. Normalerweise erfolgt die anschließende Heterodimerisierung der beiden zur Stabilisierung und zum Schutz vor proteasomaler Degradierung. Auch wenn die dafür relevanten Domänen PHD1, ePHD4 sowie FYRN präsent sind, könnte sich die relative Anordnung verändern und den Prozess der Dimerisierung beeinflussen.



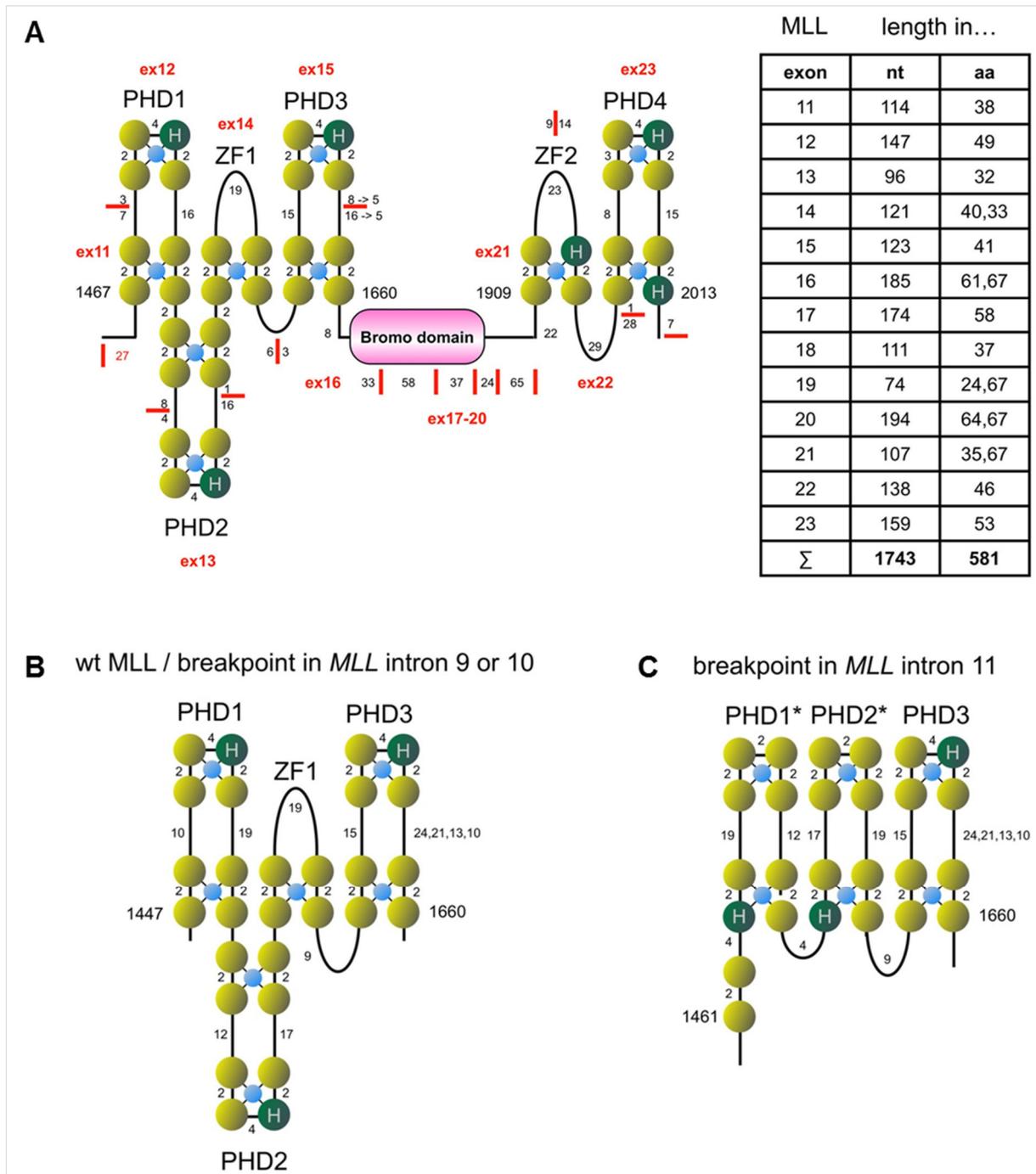
**Abbildung 5-3: MLL PHD3-Varianten und ihre Funktionen II**

Der ambivalente Charakter des MLL Proteins, welcher anhand des alternativen Spleißens des MLL PHD3-Fingers erklärbar ist wird durch Abbildung 5-3 illustriert. Allein die PHD3-3-Variante kann CYP33 binden, wodurch MLL über die Bindung inhibitorischer PRC1-Proteine als transkriptioneller Repressor agiert. Auf der anderen Seite steht die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen, wodurch die Transkription aktiviert wird. Die Abbildung wurde modifiziert nach [121].

### 5.1.2 PHD1-3 – KONSEQUENZ DER VERKÜRZTEN VARIANTE

Die MLL PHD-Finger 1-3 werden von *MLL* Exon 11 bis Exon 16 kodiert (vgl. Abbildung 5-4 A). Demnach liegt ein großer Teil dieser Domäne in der *MLL* BCR, die von *MLL* Exon 8 bis Exon 14 reicht [20]. Bevorzugt entstehen hier DNA-Doppelstrangbrüche mit der Folge chromosomaler Translokationen, sodass die Lage des Bruchpunkts die Konformation der PHD1-3-Domäne beeinflussen kann. Bereits bekannt ist das gehäufte Auftreten der Bruchpunkte am telomerischen Ende der *MLL* BCR bei akuten Säuglingsleukämien sowie bei t-AML-Patienten, während die Bruchpunkte bei adulten *de novo* Leukämien primär im centromerischen Teil der *MLL* BCR liegen und eine wesentlich bessere Prognose bedeuten [48] [50] [53] [56].

Strukturgebend für PHD-Motive ist die Anordnung der Cysteine und Histidine, weshalb ein strangabwärts des *MLL* Exon 11 gelegener Bruchpunkt in einer Modifikation der PHD1-3-Finger resultieren kann. Bei Erwachsenen *de novo* Leukämien liegt der Bruchpunkt bevorzugt in *MLL* Intron 9 oder 10, weshalb die PHD1-3-Domäne hier unbeeinflusst bleibt (vgl. Abbildung 5-4 B). Befindet sich der Bruchpunkt jedoch in *MLL* Intron 11, dem primären Vorkommen bei Säuglingsleukämien und tAMLs, dann fehlen die ersten 11 von *MLL* Exon 11 kodierten AS des PHD1-3-Motivs, unter anderem zwei an der Strukturgebung beteiligten Cysteine. Daraus könnte ein nichtfunktionaler PHD1-Finger resultieren. Alternativ ist eine abweichende Faltung des Proteins möglich, bei der zwar die beiden PHD-Domänen 1 und 2 ähnlich gefaltet sind, aber der ZF1 eliminiert wird. Die Konsequenz einer solchen Fehlfaltung könnte neben einer anderen Proteinstruktur, eine z. B. durch schnellere Degradierung veränderte Proteinstabilität oder eine funktionelle Beeinträchtigung sein. Die Verwendung der verkürzten  $\Delta$ PHD1-3-Variante neben der gesamten PHD1-3-Domäne sowohl bei den Y2H- als auch bei den CoIP-Experimenten diene der Imitation der Modifikation mit den fehlenden Cysteinen des PHD1 bei der Lage des Bruchpunktes im *MLL* Intron 11.



**Abbildung 5-4: MLL PHD-Struktur durch Anordnung der Cysteine und Histidine**

Die Abbildung 5-4 [121] zeigt die zweidimensionale Struktur der MLL PHD-Domäne. Gelb: Cystein; Grün: Histidin; Hellblau: Zinkionen; Schwarze kleine Zahlen: Anzahl der AS zwischen Cysteinen/Histidinen; Schwarze große Zahlen: Lage der AS im MLL Protein. **A) Links:** Darstellung der gesamten MLL PHD-Domäne. Die roten Balken deuten Exon-Exon-Verknüpfungen an, während die rote Schrift die jeweils kodierenden Exons angibt (ex). Die BD-Domäne zwischen dem PHD3 und dem ZF2 ist in Pink dargestellt. **Rechts:** Die Tabelle zeigt die Länge der kodierenden Exons auf. Während die mittlere Spalte die Länge in Nukleotiden (nt) angibt, ist in der rechten Spalte die Anzahl der kodierenden AS (aa) aufgelistet. **B)** Darstellung der MLL PHD1-3-Domäne, wie sie im Wildtypprotein oder bei einem Bruchpunkt in *MLL* Intron 9 bzw. 10 vorliegt. **C)** Darstellung einer möglichen alternativen Faltung bei einem Bruchpunkt in *MLL* Intron 11.

---

Die Y2H-Untersuchungen zur Dimerisierungsfähigkeit der beiden PHD1-3-Varianten mit den 4 PHD3-Spleißversionen ergaben keine messbaren Differenzen. Beide PHD1-3-Domänen zeigten eine ähnliche Fähigkeit zur Dimerisierung mit allen 4 PHD3-Fingern. Allerdings waren bei der fokussierten Betrachtung der PHD3-Domäne leichte Unterschiede erkennbar. Während der vollständige PHD3-0-Finger die größte Fähigkeit zur Dimerisierung aufwies, war bei dem mit CYP33 interagierenden PHD3-3 die geringste Dimerisierungsfähigkeit zu beobachten. Diese variierenden Resultate beim Vergleich der PHD1-3-Domäne mit dem PHD3-Finger allein deuten eine Relevanz der PHD-Finger 1 und 2 für den Prozess der mittels des PHD3 verursachten Dimerisierung an. Darunter ist eine funktionelle Stabilisierung durch den PHD1 und den PHD2 möglich.

Analysen über die Fähigkeit zur Dimerisierung bei den beiden PHD1-3-Varianten mit sich selbst bzw. der jeweils anderen Version ergab differente Resultate (vgl. Abbildung 5-5 A und B). Während die unveränderte PHD1-3-Domäne dimerisieren kann, hat die  $\Delta$ PHD1-3-Version diese Dimerisierungsfähigkeit verloren. Resultierend aus der Elimination der ersten 11 AS des PHD1, inklusive der ersten beiden Formgebenden Cysteine, ergibt sich die Unfähigkeit zur Dimerisierung. Funktionelle Relevanz zeigt sich womöglich in der blockierten Dimerbildung des reziproken AF4·MLL-Fusionsproteins.

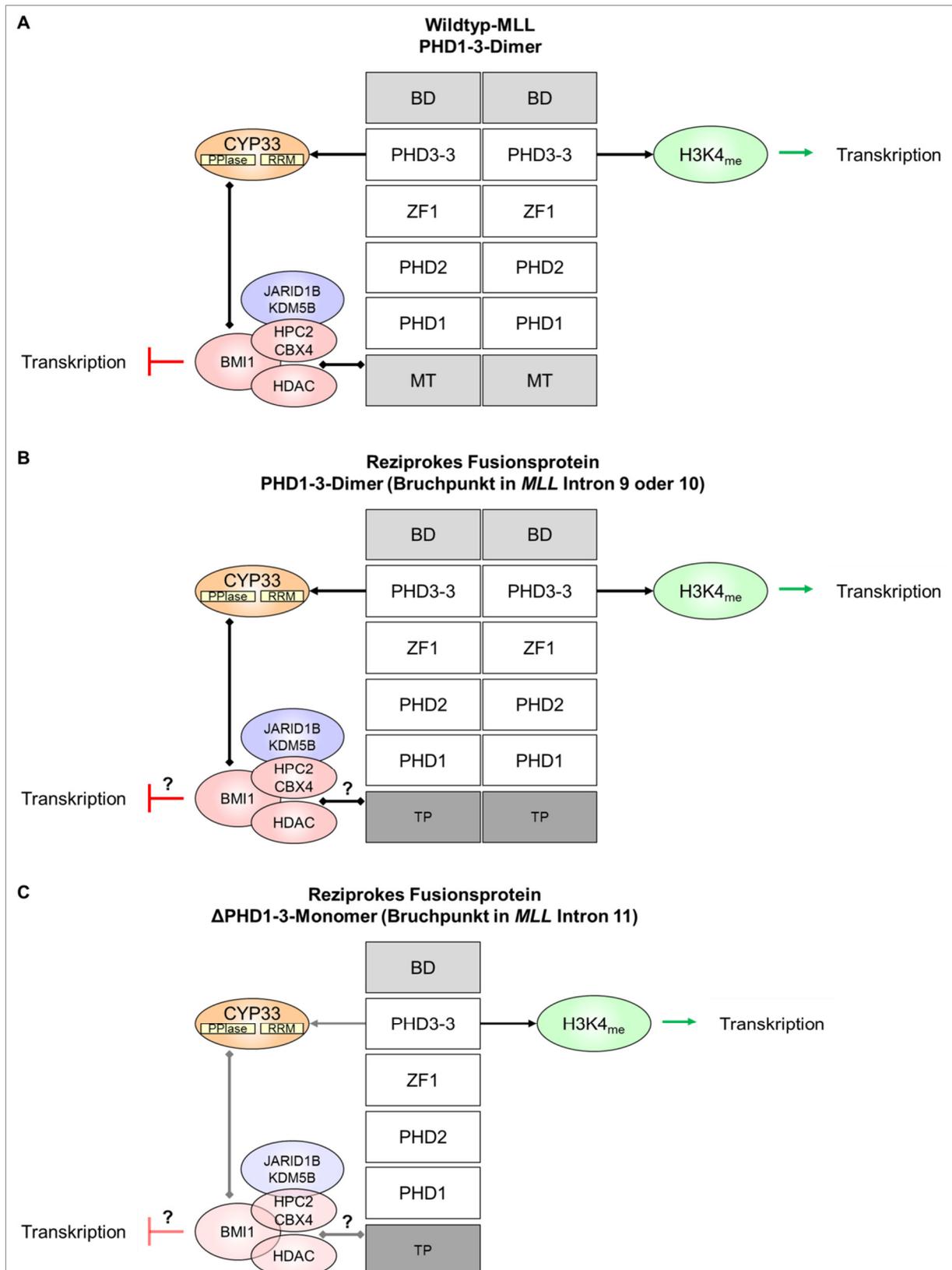
Ähnlich den Y2H- und CoIP-Experimenten mit dem PHD3-Finger können beide PHD1-3-Varianten mit dem CYP33 interagieren (vgl. Abbildung 5-5 B und C). Aufgrund der Präsenz des PHD3 als -3-Variante in beiden PHD1-3-Modifikationen, war diese beobachtete Wechselwirkung zu erwarten. Analog ist bei der unveränderten PHD1-3-Variante eine wesentlich stärkere Interaktion mit dem vollständigen CYP33 als mit dessen RRM-Domäne allein zu erkennen. Diese Feststellung verstärkt den Hinweis auf die bereits vermutete Beteiligung anderer Domänen als dem CYP33 RRM-Motiv sowie dem PHD3 für deren Interaktion. Im Gegensatz zur unmodifizierten PHD1-3-Domäne ist die Interaktion der verkürzten Version mit dem gesamten CYP33 geringfügig schwächer ausgeprägt. Zusätzlich ist keine Wechselwirkung mit dem CYP33 RRM-Motiv alleine zu erkennen. Daraus könnte sich für die  $\Delta$ PHD1-3-Domäne eine reduzierte Bindung der inhibitorischen Proteine des PRC1-Komplexes ergeben. Infolgedessen würde die Aktivität als transkriptioneller Repressor abnehmen, während die transkriptionell aktivierende Funktion über die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen eine besondere Bedeutung bekommt.

---

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass alle reziproken MLL-Fusionsproteine mit normaler oder verkürzter PHD1-3-Domäne die beim Wildtyp-*MLL* strangaufwärts gelegene MT-Domäne nicht exprimieren (vgl. Abbildung 5-5 B und C). Als Bindestelle für die durch das CYP33 rekrutierten, inhibitorischen Proteine des PRC1-Komplexes hat dieses Motiv enorme Wichtigkeit für die transkriptionell repressive Funktion [82]. Aus diesem Grund bleibt zu klären, ob die reziproken MLL-Fusionsproteine auch ohne MT-Domäne weiterhin die PRC1-Proteine binden und dementsprechend die Transkription inhibieren können. Wenn die beschriebene Interaktion nicht mehr möglich ist, wäre das eine denkbare Erklärung für die onkogenen Effekte des reziproken AF4·MLL-Fusionsprotein [161] [206] [210].

In diesem Zusammenhang ist auch die durch den geninternen Promotor im *MLL*-Gen bedingte Expression des MLL\*-Proteins interessant [54]. Dieser Promotor ist notwendig für die Expression des MLL C-Terminus in Patienten, bei denen kein funktionales reziprokes Fusionsprotein detektierbar ist [42]. Die Kodierung für das entstehende am N-Terminus verkürzte MLL\*-Protein startet inmitten des *MLL* Exon 18. Deshalb sind zwar der ZF2 und der PHD4 vorhanden, aber neben der nicht vorhandenen PHD1-3-Domäne fehlt auch die BD-Domäne.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist auch hier die Relevanz der verkürzten PHD1-3-Domäne für die Dimerisierung der beiden Fragmente, welche durch die Taspase 1 vermittelte proteolytische Spaltung des AF4·MLL-Fusionsprotein entstehen. Der durch intramolekulare Interaktion über die FYRN- und die FYRC-Domänen gebildete Komplex wird sowohl durch den PHD1 als auch den PHD4 stabilisiert. Durch die Verkürzung kann die Funktionalität des PHD1 modifiziert werden.



### Abbildung 5-5: Einfluss des Bruchpunkts auf die Funktion der PHD1-3-Domäne

Die Abbildung 5-5 wurde modifiziert nach [121]. **A)** Darstellung des ambivalenten Charakters des MLL-Wildtypproteins mit der Funktion als transkriptioneller Aktivator über die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen sowie die CYP33-vermittelte repressive Aktivität. **B)** Bei einem Bruchpunkt in *MLL* Intron 9 oder 10 liegt die PHD1-3-Domäne im reziproken Fusionsprotein unverändert vor. Eine Dimerisierung ist neben der Bindung von CYP33 oder der Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen weiterhin möglich. Aufgrund der fehlenden MT-Domäne, an deren Stelle beim reziproken Fusionsprotein Domänen des Translokationspartners (TP) präsent sind, ist die Interaktion zwischen dem MLL und den inhibitorischen PRC1-Proteinen nicht zwingend notwendig. Die CYP33 vermittelte Funktion als transkriptioneller Repressor bleibt damit weiter zu analysieren. Eventuell zeigen Domänen des Translokationspartners eine ähnliche Aktivität wie die MT-Domäne. **C)** Bei einem Bruchpunkt in *MLL* Intron 11 liegt die PHD1-3-Domäne im reziproken Fusionsprotein als verkürzte Variante  $\Delta$ PHD1-3 vor. Neben der nicht mehr vorhandenen Fähigkeit zur Dimerisierung, ist auch die geringfügig schwächere Interaktion mit dem CYP33 zu beachten. Die Erkennung von H3K4<sub>me</sub>-Signaturen durch den PHD3-Finger bleibt unverändert. Auch hier ist die CYP33 vermittelte repressive Aktivität nicht notwendigerweise vorhanden aufgrund der fehlenden MT-Domäne, welche die inhibitorischen PRC1-Proteine bindet. Möglicherweise können Domänen des Translokationspartners diese Funktion übernehmen.

## 5.2 PROTEIN-INTERAKTIONSNETZWERK DES AF4- UND AF4·MLL-MPC

Das *AF4*-Gen stellt das häufigste TPG in ALLs mit einem *MLL*-Rearrangement dar. Die resultierende t(4;11)-Translokation ist assoziiert mit einer extrem schlechten Prognose und weist eine mit hoher Therapieresistenz verbundene Rezidivrate auf (vgl. 2.3.1). Die gebildeten Fusionsproteine AF4·MLL und MLL·AF4 sind Bestandteile von MPCs, welche Komponenten der Wildtypproteinkomplexe um AF4 und MLL enthalten (vgl. 2.7 und Abbildung 2-8). Da das AF4·MLL besonders in Bezug auf den Therapieerfolg für die Leukämogenese relevant ist [63] [67], ist die Aufklärung der Komposition sowie der Funktion des AF4·MLL-MPCs von großem Interesse. In verschiedenen Studien konnten Interaktionspartner identifiziert und in weiteren Experimenten verifiziert werden, wobei hierbei zusätzlich neue Komponenten entdeckt wurden. Die genaue Zusammensetzung scheint bis heute allerdings nicht vollständig geklärt zu sein [167]. Außerdem lag der bisherige Schwerpunkt auf der Identifizierung und Verifizierung der an der Assemblierung der MPCs beteiligten Proteine. Die bisher eher geringe Kenntnis über vorhandene Interaktionen der einzelnen Proteine untereinander konnte durch die in dieser Arbeit vorgestellten Y2H-Experimente wesentlich erweitert werden.

Die hier beobachtete Fähigkeit des N-terminalen AF4 zur Homodimerisierung ist konform mit der Kenntnis über Präsenz des AF4 als Wildtypprotein im AF4·MLL-MPC [167]. Daneben wurde eine leichte Interaktion des AF4 N-Terminus zum ebenfalls zur

Familie der ALF-Proteine gehörenden AF5 detektiert, wobei ähnlich zum AF4 auch beim AF5 das N-terminale Ende für die Wechselwirkung relevant ist. Diese Heterodimerisierung wurde bereits für die Bildung des humanen AEP-Komplexes beschrieben [166]. Für den N-Terminus des AF4 wurde weiterhin eine leichte Bindung an das BRD4 gefunden, welches zwar als Bestandteil des AF4-MPC, aber nicht des AF4·MLL-MPC gilt und durch die Stimulierung der Kinasefunktion des P-TEFb die RNA Pol II in den Status der transkriptionellen Elongation überführt [167]. Eine hier gefundene, aber nicht mit bisherigen Daten übereinstimmende Interaktion stellt die Bindung des AF4 N-Terminus an die Fragmente 3 und 4 des DOT1L (DOT1L-3 und DOT1L-4) dar. Entsprechend vorangegangener Berichte anderer Arbeitsgruppen wurde die am AF4 C-Terminus bindende Histonmethyltransferase DOT1L zwar im AF4-MPC, aber nicht im AF4·MLL-MPC identifiziert [167]. Diese Tatsache spricht für die Bindung am AF4 C-Terminus, welcher durch das Fehlen im AF4·MLL auch nicht für eine Interaktion mit DOT1L im AF4·MLL-MPC zur Verfügung steht. Konträr dazu stimmt die Interaktion des AF4 N-Terminus mit dem Fragment 3 der H3K36- und H4K20-Histonmethyltransferase NSD1 (NSD1-3) mit der Entdeckung dieser als Bestandteil des AF4-Komplexes überein [167] und liefert neue Kenntnisse über eine direkte Bindung des AF4 an NSD1. Ebenso ist die hier detektierte Wechselwirkung des N-terminalen AF4 mit der p65-Untereinheit RELA des NFκB bereits bekannt [167]. Dabei zeigten beide RELA-Fragmente (RELA-1 und RELA-2) Bindungen an AF4.

Die Interaktion zwischen AF4 mit P-TEFb, einem Heterodimer aus CCNT1 und CDK9, findet über den AF4 N-Terminus statt. Diese Wechselwirkung mit der folgenden Stimulierung der transkriptionellen Elongation durch die RNA Pol II ist ebenso bekannt wie die Beteiligung des AF4 N-Terminus an dieser Interaktion mit P-TEFb [165] [166] [167] [168]. Auf der Seite des P-TEFb wird bevorzugt das CCNT1 gebunden und weniger das CDK9. Eine ähnliche Konstellation wurde für die Bindung von AF5 an P-TEFb im Komplex mit dem HIV-1 Tat-Protein beschrieben (vgl. Abbildung 2-9) [227]. Die genauere Betrachtung zeigt, dass die Bindung mit dem gesamten CCNT1 ebenso wie mit dessen mittleren Part (CCNT1-2) wesentlich stärker ausfällt als die Wechselwirkung mit dem CCNT1 N-Terminus (CCNT1-1). Während das CCNT1-1 die CCL1-Region, die Cyclinbox-Faltung sowie das CDK9-*Interface* umfasst, besitzt das CCNT1-2 ausschließlich einen weiteren Teil der CCL1-Region. Die nennenswert schwächere Interaktion mit CDK9 wurde vor allem für den CDK9

---

C-Terminus mit NLS und CTD (CDK9-3), aber weniger für den N-Terminus mit ATP-Bindestelle und CDK9/Cyclin-*Interface* (CDK9-1) detektiert.

Bei Betrachtung der Untereinheiten des Heterodimers P-TEFb fällt deren starke Interaktion untereinander auf, welche erstmals 1998 beschrieben wurde [268] [269]. Während das gesamte CCNT1 eine starke Interaktion zu CDK9 aufweist, ist diese Wechselwirkung weder bei CCNT1-1 noch bei CCNT1-2 präsent. Diese Beobachtung lässt auf eine Interaktion des CDK9 mit dem CCNT1 C-Terminus schließen. Dem widerspricht jedoch die Kenntnis über das vorhandene CDK9-*Interface* im CCNT1-1. Dagegen stimmt die überwiegende Bindung des CCNT1 durch den N-Terminus des CDK9 mit ATP-Bindestelle und CCNT1/CDK9-*Interface* (CDK9-1) mit vorigen Berichten anderer Arbeitsgruppen überein [270]. Zusätzlich wurde hier allerdings eine schwächere Interaktion mit dem CDK9 C-Terminus mit NLS und CTD (CDK9-3), aber nicht mit dessen mittleren Part (CDK9-2) detektiert. Weiterhin konnte für das CCNT1 die bisher noch nicht beobachtete Fähigkeit zur Homodimerisierung über Domänen in CCNT1-1 und CCNT1-2 beobachtet werden.

Die starke Interaktion des CCNT1 mit AF5 konnte hier verifiziert werden. Diese Assoziation zu P-TEFb wurde zuerst für das neueste Mitglied aus der Familie der ALF-Proteine identifiziert [214]. Ähnlich dem AF4 interagiert auch das AF5 über seinen N-Terminus (AF5-1) mit CCNT1. Diese Beobachtung entspricht dessen Bindung im Komplex mit P-TEFb und dem HIV-1 Tat-Protein [227]. Allerdings muss beachtet werden, dass das AF5 nur eine Komponente des AF4- und nicht des AF4·MLL-MPC darstellt. Im Gegensatz zu AF5 konnte für das BRD4 nur eine extrem schwache Wechselwirkung mit dem CCNT1 detektiert werden. Dieses gilt als positiver Regulator des P-TEFb [271] [272] und wurde wie das AF5 nur im AF4-, aber nicht im AF4·MLL-MPC nachgewiesen [167]. Eine weitere Interaktion mit dem CCNT1 zeigte das Fragment 3 des DOT1L (DOT1L-3). Diese erfolgte am stärksten beim gesamten CCNT1 und sowohl durch das CCNT1-1 als auch über das CCNT1-2. Konträr dazu war eine extrem schwache Wechselwirkung mit dem Fragment 4 (DOT1L-4) nur bei dem CCNT1-1 erkennbar. Die Präsenz der beiden Proteine CCNT1 als Teil des P-TEFb und DOT1L in einem Komplex mit AF4, ENL/AF9 und AF10 sowie die DOT1L-Rekrutierung zur RNA Pol II wurde bereits gezeigt [165]. Allerdings war eine Interaktion zwischen den beiden bisher nicht bekannt. Ebenso scheint die Wechselwirkung des CCNT1 mit NSD1 bisher nicht genauer definiert zu sein. Neben den NSD1-Fragmenten 2 und 6 (NSD1-2 und NSD1-6), welche hier mit dem gesamten CCNT1

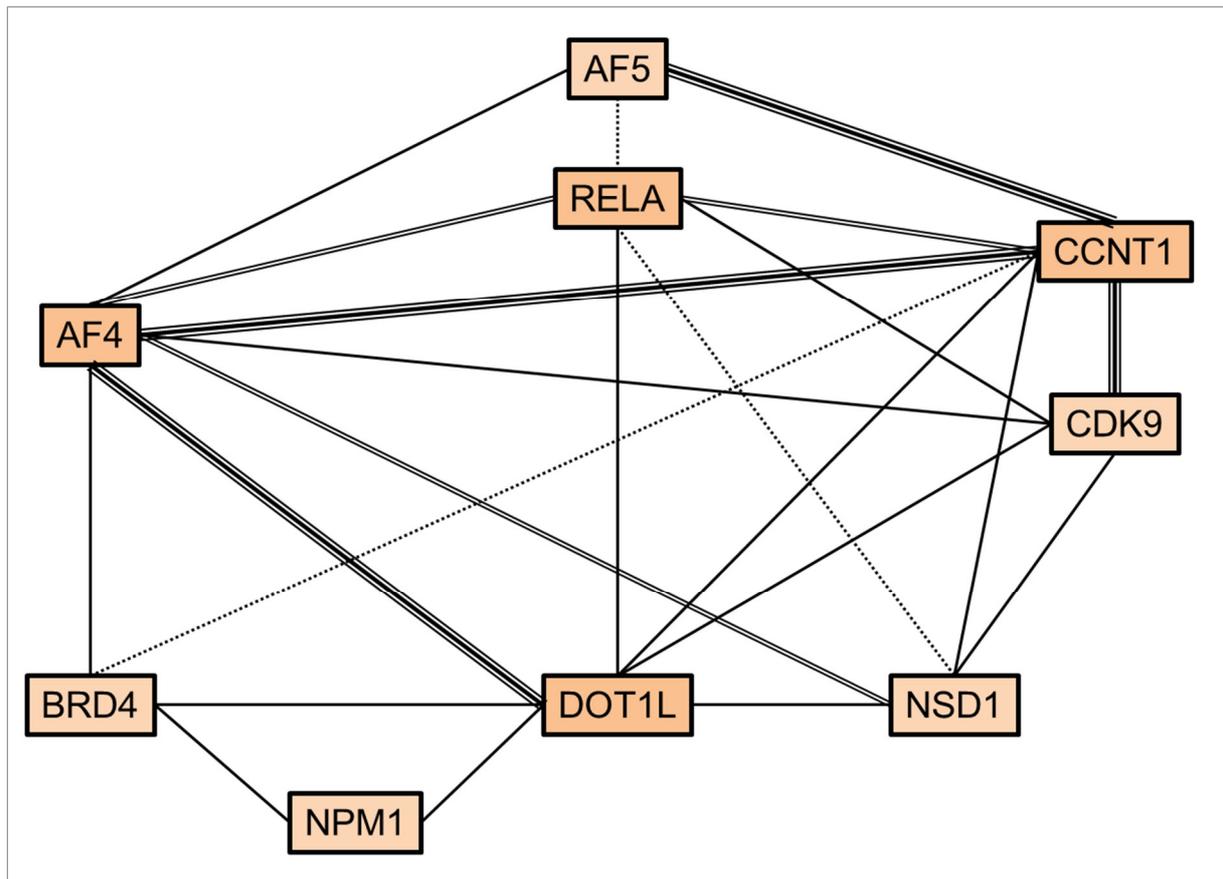
interagierten, zeigte das Fragment 3 (NSD1-3) Bindungen an CCNT1-1 sowie extrem schwach an CCNT1-2. Außerdem konnten Interaktionen zwischen dem CCNT1 und der p65-Untereinheit RELA des NFκB detektiert werden. Dabei zeigten jedoch die Fragmente 1 und 2 des CCNT1 (CCNT1-1 und CCNT1-2) Bindungen an das Fragment 1 von RELA, während das gesamte CCNT1 mit dem Fragment 2 des RELA (RELA-2) interagiert. Diese Interaktion zwischen den beiden Proteinen wurde bei der P-TEFb-abhängigen Stimulierung der RNA Pol II durch NFκB bereits gezeigt [273].

Die Interaktionen der Fragmente 1 und 3 des CDK9 (CDK9-1 und CDK9-3) mit dem Fragment 3 des DOT1L (DOT1L-3) zeigen, dass nicht allein die CCNT1-Untereinheit des P-TEFb an die Histonmethyltransferase DOT1L bindet. Wie oben schon erwähnt wurden beide gemeinsam in einem Komplex nachgewiesen, aber die Wechselwirkung zwischen den zwei Proteinen wurde bisher noch nicht erwähnt. Ebenso wie für CCNT1-1 und CCNT1-2 wurden hier auch für die CDK9-Fragmente 1 und 3 (CDK9-1 und CDK9-3) Wechselwirkungen mit dem Fragment 3 des NSD1 (NSD1-3) detektiert, die beim CDK9-1 jedoch extrem schwach ausgeprägt waren. Allerdings werden auch diese Interaktionen in der Literatur bisher nicht erwähnt. Des Weiteren wurde eine Bindung von CDK9 an das Fragment 1 des RELA (RELA-1) nachgewiesen, die beim gesamten CDK9 sowie dessen Fragment 2 nur extrem schwach, aber bei den Fragmenten 1 und 3 wesentlich stärker ausgeprägt waren. Wie oben beschrieben, wurde bereits eine Interaktion zwischen P-TEFb und NFκB gezeigt, welche jedoch über die CCNT1-Untereinheit des P-TEFb erfolgt [273].

Die H3K79-Methyltransferase DOT1L wurde für die Y2H-Versuche in 4 Fragmente aufgeteilt. Neben den bisher beschriebenen Interaktionen mit AF4 sowie den beiden P-TEFb-Untereinheiten CCNT1 und CDK9 konnten weitere Interaktionspartner nachgewiesen werden. Dazu gehören das BRD4, das Fragment 1 des NPM1 (NPM1-1) sowie das Fragment 3 des NSD1 (NSD1-3). Diesen Proteinen bzw. Proteinfragmenten ist gemeinsam, dass sie allein mit dem Fragment 3 des DOT1L (DOT1L-3) interagieren. Interessant ist, dass auch BRD4 und NPM1-1 untereinander Wechselwirkungen zeigen. BRD4 interagiert als positiver P-TEFb-Regulator mit freiem P-TEFb und erhöhte BRD4-Level sind assoziiert mit verstärkter RNA Pol II-CTD-Phosphorylierung [271]. NPM1 kann dagegen die Menge an freiem P-TEFb erhöhen durch Initiierung der proteasomalen Degradierung von HEXIM1 [274], welches im Komplex mit der 7SK snRNA einen inhibierenden Einfluss auf P-TEFb

zeigt [275] [276]. Alle zuletzt genannten Bindungen sind so bisher allerdings noch nicht erwähnt worden, außer der direkten Interaktion von DOT1L mit NPM1 im DOT1L-Komplex [277]. Zusätzlich konnte eine Bindung des DOT1L-3 an beide RELA-Fragmente (RELA-1 und RELA-2) detektiert werden, wobei die an RELA-1 stärker ausfiel. Außerdem konnten auch für die DOT1L-Fragmente 1 und 2 (DOT1L-1 und DOT1L-2) sehr schwache Interaktionen mit RELA-1 nachgewiesen werden. Für die DOT1L-Fragmente 2 und 3 (DOT1L-2 und DOT1L-3) war jeweils Homodimerisierung zu beobachten und etwas schwächere Interaktionen zwischen den Fragmenten 3 und 4 (DOT1L-3 und DOT1L-4) wurden detektiert.

Auch für die p65-Untereinheit RELA des NFκB konnten neben den oben erwähnten Interaktionen mit AF4, CCNT1, CDK9 und DOT1L weitere Interaktionspartner detektiert werden. Die extrem schwache Bindung des RELA-Fragments 1 (RELA-1) an das Fragment 2 des AF5 (AF5-2) erscheint neu. Dagegen wurde eine Wechselwirkung zwischen RELA und NSD1 bereits beschrieben. NSD1 agiert dabei als ein aktivierender NFκB-Regulator durch die Methylierung der p65-Untereinheit RELA an den Lysinresten 218 und 221 [278]. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Y2H-Experimenten interagiert das RELA-Fragment 1 (RELA-1) mit den NSD1-Fragmenten 2 und 4 (NSD1-2 und NSD1-4). Des Weiteren wurden sehr schwache Bindungen an NSD1-1, NSD1-3 und NSD1-6 festgestellt. Entsprechend der vorher beschriebenen Methylierungen an K218 und K221 müsste eigentlich das RELA-Fragment 2 (RELA-2) mit NSD1 interagieren. Schließlich wurde eine Wechselwirkung zwischen den beiden RELA-Fragmenten RELA-1 und RELA-2 detektiert. Eine solche Homodimerisierung der p65-Untereinheit des NFκB konnte bereits in *Flourescence Resonance Energy Transfer* (FRET)-Experimenten gezeigt werden [279]. Außerdem wurden viele Jahre zuvor neben den die NFκB-abhängige Transkription stimulierenden p65-Homodimeren auch repressive p50-Homodimere identifiziert [280].



#### Abbildung 5-6: Zusammenfassung der Y2H-Experimente mit den AF4-/AF4-MLL-Proteinen

Die Abbildung 5-6 versucht die gesamten Ergebnisse der Y2H-Experimente mit den Proteinen des AF4- und AF4·MLL-MPCs in einem Diagramm darzustellen. Dabei wird immer das ganze Protein unabhängig von den verwendeten Fragmenten betrachtet bzw. die Ergebnisse für die einzelnen Fragmente für ein Protein zusammengeführt. Die geringfügig dunkler gefärbten Proteine AF4, CCNT1, DOT1L und RELA zeigten die Fähigkeit zur Homodimerisierung.

Orange: Getestetes Protein; Linien: Interaktion (3fach: sehr stark; 2fach: stark; 1fach: normal; gepunktet: sehr schwach).

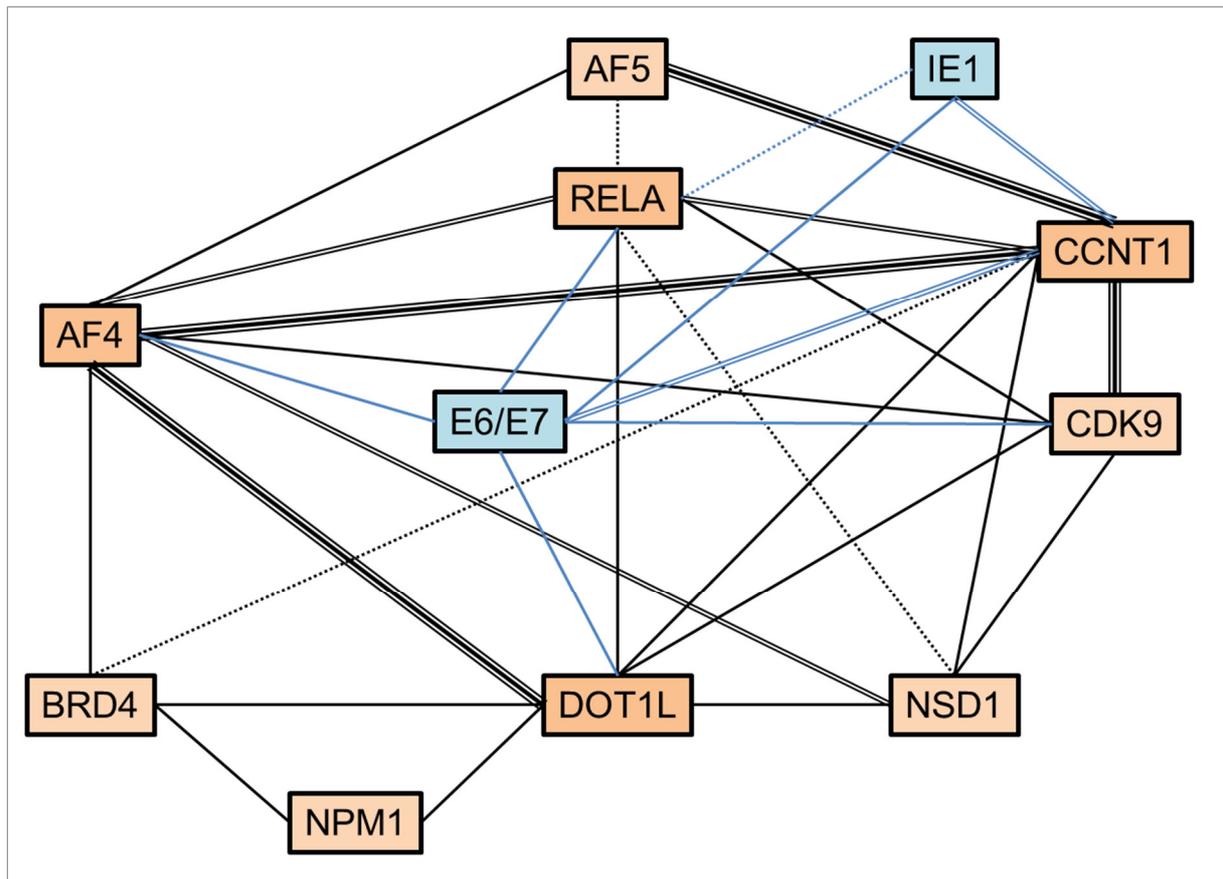
### 5.2.1 BETEILIGUNG VIRALER PROTEINE AM AF4- UND AF4·MLL-MPC

Das AF4-Protein wurde als Kofaktor viraler Proteine, besonders der IE-Proteine des HCMV und des EBV identifiziert. Vor allem das HCMV IE1-Protein beeinflusst AF4-abhängige Effekte und ist eine Komponente des AF4-MPC. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die IE-Proteine des HCMV und des EBV AF4-MPCs induzieren sowie deren funktionelle Verfügbarkeit erhöhen können (vgl. Doktorarbeit Dr. Bastian Scholz 2013, ehemals Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main).

Für das IE1-Protein des HCMV konnten mithilfe des Y2H-Systems Interaktionen zum AF4- bzw. AF4·MLL-MPC über CCNT1 und RELA detektiert werden. Im Gegensatz zu der Bindung an CCNT1 über Domänen des Fragments 2 (CCNT1-2) ist die Wechselwirkung mit dem RELA-Fragment 1 (RELA-1) extrem schwach ausgeprägt. Zusätzlich wurde eine Interaktion des IE1 mit den HPV IE-Proteinen E6/E7 beobachtet.

Für die HPV Onkoproteine E6/E7 konnten Interaktionen zum AF- bzw. AF4·MLL-MPC über AF4, CCNT1, CDK9, DOT1L und RELA identifiziert werden. Die stärkste Wechselwirkung zeigte sich mit dem gesamten CCNT1, welche vor allem über Domänen im Fragment 2 (CCNT1-2) und weniger im Fragment 1 (CCNT1-1) zustande kommen. Die Interaktion mit der zweiten P-TEFb-Untereinheit CDK9 erfolgt bevorzugt über Bereiche im Fragment 3 (CDK9-3). Auch in Bezug auf RELA wird vermehrt an C-terminale Domänen, also im Fragment 2 (RELA-2), gebunden. Dagegen zeigte sich die Interaktion mit DOT1L ausschließlich mit dessen Fragment 3 (DOT1L-3). Weiterhin konnte auch hier eine Wechselwirkung mit dem HCMV IE1 gezeigt werden. Konträr zu den Arbeiten von Dr. Bastian Scholz, bei denen kein Einfluss der HPV IE-Proteine auf den AF4- bzw. AF4·MLL-MPC bzw. deren Effekte und Funktionen zu sehen war, scheint eine Beteiligung der HPV-Proteine E6/E7 an den beiden MPCs aufgrund der Y2H-Experimente zumindest möglich.

Die Ergebnisse der Y2H-Experimente mit dem BZLF1-Protein des EBV wurden aufgrund der vielen vermutlich unspezifischen Bindungen nicht gezeigt und werden deshalb auch nicht diskutiert.



**Abbildung 5-7: Y2H-Ergebnisse für die AF4-/AF4-MLL-Proteine inklusive viraler Proteine**

Die Abbildung 5-7 versucht die gesamten Ergebnisse der Y2H-Experimente mit den Proteinen des AF4- und AF4-MLL-MPCs inklusive der getesteten viralen Proteine in einem Diagramm darzustellen. Dabei wird immer das ganze Protein unabhängig von den verwendeten Fragmenten betrachtet bzw. die Ergebnisse für die einzelnen Fragmente für ein Protein zusammengeführt. Die geringfügig dunkler gefärbten Proteine AF4, CCNT1, DOT1L und RELA zeigten die Fähigkeit zur Homodimerisierung.

Orange: Getestetes Protein des AF4-/AF4-MLL-MPCs; Blau: Getestetes virales Protein; Linien: Interaktion (3fach: sehr stark; 2fach: stark; 1fach: normal; gepunktet: sehr schwach; schwarz: Interaktionen unter Proteinen des AF4-/AF4-MLL-MPCs; blau: Interaktionen mit viralen Proteinen).

### **5.2.2 WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN**

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-Experimenten konnten viele Interaktionen zwischen Komponenten des AF4- sowie des AF4·MLL-MPCs verifiziert bzw. genauer gezeigt werden. Zusätzlich wurden bisher noch nicht beschriebene Wechselwirkungen zwischen Proteinen identifiziert, welche meist schon gemeinsam in verschiedenen Proteinkomplexen nachgewiesen wurden. Allerdings fehlte oft der Nachweis über deren direkte Interaktion miteinander. Das Y2H-System erlaubt die schnelle und einfache Identifizierung vieler Protein-Protein-Interaktionen. Allerdings ist die Detektion von falsch-positiven Interaktionen nicht vollständig auszuschließen. Außerdem kann die physiologisch getrennte Lokalisation der getesteten Proteine ebenso wie die Präsenz kompetitiver Ereignisse die hier identifizierten Interaktionen als falsch-positiv darstellen. Deshalb wird die Durchführung weiterer Experimente wie z. B. CoIP-Untersuchungen zur Bestätigung der hier gefundenen Wechselwirkungen als sinnvoll erachtet. Solche Versuche sind bereits in Planung. Aufgrund von Problemen bei der Expression der hier genutzten Konstrukte in HEK293T-Zellen, sind bisher keine Ergebnisse verfügbar.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 MATERIAL

6.1.1 CHEMIKALIEN		Bezugsquelle
Aceton		Roth
Acrylamid		Roth
Adenin	Ade	Roth
Agar		Sigma
Agarose		Invitrogen
Albumin Fraktion V (Rinderserumalbumin)	BSA	Roth
6-Aminocaprinsäure		Roth
Ammoniumperoxodisulfat	APOD	Roth
Ampicillin	Amp	Roth
Bacto™-Trypton		Oxoid
Bisacrylamid		Roth
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	X-Gal	Roth
Bromphenolblau		Roth
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Merck
Chloramphenicol		Roth
Desoxynukleosidtriphosphate	dNTPs	Peqlab
Difco™-Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren		BD
Difco™-Pepton		BD
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma
Dithiothreitol	DTT	Biomol
DO-Supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp		Clontech
DO-Supplement -Leu/-Trp		Clontech
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Roth
Ethanol		Roth
Ethidiumbromid		Sigma
Glucose		Merck
Glycerin 86%		Roth
Hefeextrakt		Oxoid
Histidin	His	Roth

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	IPTG	Saxon
Isopropanol		Roth
Kaliumacetat	KAc	Roth
Kaliumhydroxid	KOH	Roth
Kanamycin	Kan	Roth
Leucin	Leu	Roth
Lithiumacetat	LiAc	Sigma
$\lambda$ -DNA (für DNA-Marker)		MBI Fermentas
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Merck
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol		Roth
Methanol		Roth
MG-132		Calbiochem
Natriumacetat	NaAc	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat	SDS	Biomol
Natriumfluorid	NaF	Riedel De Haen
Natriumhydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Natriumorthovanadat	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Roche
Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,2 (1x)	PBS	PAA
Polyethylenimin	PEI	Sigma
Polyethylenglykol 3350	PEG	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten		Roche
Protein-G-Agarose		Santa Cruz
Saccharose		Roth
Salzsäure		Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	TEMED	Roth
Tris-HCl		Roth
Triton-X 100		Sigma
Tryptophan	Trp	Roth
Tween-20 (Polysorbat 20)		Roth
<i>Yeastmaker</i> <sup>TM</sup> Carrier DNA ( <i>Salmon sperm DNA</i> )		Clontech
Xylencyanol FF		Merck

6.1.2 KITS	Bezugsquelle
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
HiDi™ Formamide	Applied Biosystems
PCR Purification Kit	Qiagen
Pure Yield™ Plasmid Midiprep/Maxiprep System	Promega
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

6.1.3 GRÖßENMARKER	Bezugsquelle
100 bp DNA ladder	NEB
1 kb DNA ladder	NEB
50 bp DNA ladder	NEB
λ-DNA-Marker aus λ-DNA	MBI Fermentas
Prestained Protein ladder, broad range (P7708/P7710/P7711)	NEB

6.1.4 ENZYME	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	NEB
DNase	Qiagen
Lysozym	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
RNase	Sigma
Restriktionsendonukleasen (und Puffer)	NEB
T4-DNA-Ligase (und Puffer)	NEB
T4-DNA-Quick-Ligase (und Puffer)	NEB
Taq-Polymerase (und Puffer)	Promega

6.1.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN	Bezugsquelle
Centrifuge Tubes 50 ML (Zentrifugengefäße)	Corning
Chromatographiepapier 3 MM	Whatman
Einmalimpfschlingen (10 µl/1 µl)	Nunc
Falcons (15 ml/50 ml)	Greiner bio-one
Genetic Analyzer Tubes 0,5 mL (Sequenziergefäße)	Applied Biosystems
Gewebekulturschalen	Ø 15 cm Greiner bio-one

Gewebekulturschalen	Ø 10 cm	Sarstedt
Gewebekulturschalen	96-well	Greiner bio-one
Nitril-Einweghandschuhe		VWR
PCR tubes (PCR Reaktionsgefäße)		Greiner bio-one
Parafilm "M"		Pechiney
Petrischalen		Greiner bio-one
Pipetten (Steril: 25 ml/10 ml/5 ml/2 ml)		Corning
Pipettenspitzen (1000 µl/200 µl/20 µl)		Greiner bio-one
Pipettenspitzen mit Filter (1000µl/200 µl/20 µl)		Greiner bio-one
PVDF Membran		GE Healthcare
Reaction tubes 1,5 ml (Reaktionsgefäße)		Greiner bio-one

6.1.6 GERÄTE	Bezugsquelle
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Accu-Jet	Brand
Analysenwaage TE124S-OCE	Sartorius
Blotting-Apparatur für <i>Semi-dry</i> Western Blots	CBS Scientific
Brutschränke	Heraeus
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific
Durchlichtmikroskop	Nikon
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Owl
Electrophoresis Power Supply EV265	Consort
Electrophoresis Power Supply E865	Consort
Elektroporator Gene Pulser™	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Zeiss
Gefrierschränke (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschränke (-80 °C)	Heraeus
Heizblock	VWR
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührer RCT Basic mit Heizung	IKA Labortechnik
Nanophotometer	Implen
PCR-Geräte GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
pH-Meter RCTbasic	Inolab
Pipetten SL20, SL200, SL1000	Rainin
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph

Power Source 300V	VWR
Rotator SB3	Stuart
Schüttelinkubator CH4103	Infors AG
Spectrophotometer GeneQuant 1300	GE Healthcare
Spektralphotometer U-2000	Hitachi
SterilGard Hood (LaminAir HB2472)	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikroplatten Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Tischzentrifugen (5424, 5415D, 5415 C)	Eppendorf
Transilluminator	Biostep
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbäder	Julaba
Zellzähler Casy	Roche Innovatis AG
Zentrifuge J2-HS (Rotor JA 20)	Beckmann
Zentrifuge J6-HC (Rotor JLA 10,5)	Beckmann

### 6.1.7 PUFFER & LÖSUNGEN

Anodenpuffer I pH 10,4 (Western Blot)	300 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4 (Western Blot)	25 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl Methanol
DNA-Ladepuffer	50 % (w/v) 100 mM 0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v)	Saccharose EDTA Bromphenolblau Xylencynol FF
E-Gelpuffer pH 7,9	40 mM 2 mM 0,5 mM	Tris-HCl EDTA NaAc
Elektrodenpuffer	3,03 g 14,4 g 1,0 g ad 1 l	Tris-HCl Glycin SDS Wasser
Kathodenpuffer pH 9,4 (Western Blot)	25 mM 40 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl 6-Aminocapronsäure Methanol
Lämmli-puffer 2x	100 mM 200 mM 4 % (w/v) 20 % (v/v) 0,2 % (w/v)	Tris-HCl pH 6,8 DTT SDS Glycerol Bromphenolblau

LiAc 10x (Hefetransformation)	1 M	LiAc mit verdünnter Essigsäure auf pH 7,5 einstellen
Low TE	10 mM 0,1 mM	Tris-HCl pH 8 EDTA
Lysispuffer (Zelllysate)	150 mM 20 mM 0,4 mM 1 % (v/v)	NaCl HEPES pH 7,5 EDTA TritonX-100
Frisch zugeben:	1 mM 10 mM 1 mM 1 x	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> NaF PMSF PIC
PEG 50 % (Hefetransformation)	50 % (w/v)	PEG 3350
PEG/LiAc (Hefetransformation)	40 % 1 x 1 x	PEG 4000 TE LiAc
Sammelgelpuffer pH 6,8 (SDS-PAGE)	1 M	Tris-HCl pH 6,8
ST-Puffer pH 8,8 (DNA-Minipräparation)	80 % (w/v) 5 % (v/v) 50 mM 50 mM	Saccharose TritonX-100 EDTA Tris-HCl
<i>Stripping</i> -Puffer	100 ml 31,25 ml ad 500 ml	SDS 10% Tris-HCl pH 6,8 H <sub>2</sub> O
Frisch zugeben/10 ml:	78 µl	β-Mercaptoethanol
TBE-Puffer	100 mM 500 mM 2,5 mM	Tris-HCl H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> EDTA
TBS-Puffer	50 mM 150 mM	Tris-HCl NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
TBST-Puffer	+ 0,1 %	TBS-Puffer Tween 20
TE-Puffer 10x pH 7,5	0,1 M 10 mM	Tris-HCl EDTA
Trenngelpuffer pH 8,8 (SDS-PAGE)	1 M	Tris-HCl pH 8,8
Waschpuffer pH 8,0 (RNA-Bindung)	125 mM 150 mM	Tris-HCl pH 8,0 NaCl

### 6.1.8 ORGANISMEN UND NÄHRMEDIEN

Bakterienstämme	Genotyp
JM110	<i>rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>R</sup> lacZΔM15] hsdR17(r<sub>K</sub>m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>
TOP10F'	<i>F' {lacIq, Tn 10(TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>

Medien für Bakterien	Zusammensetzung		
Salzlösung (Elektroporation)	1	M	NaCl
	100	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	MgSO <sub>4</sub>
SOB-Medium mit Glucose (SOC)	2	% (w/v)	Bacto™-Trypton
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,25	% (v/v)	Glucoselösung 40 % (w/v)
YT-Medium	1	% (w/v)	Bacto™-Trypton
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
YT-Medium mit Agar	+ 1,2	% (w/v)	YT-Medium Agar
YT-Medium mit Amp	+ 100	μg/ml	YT-Medium Ampicillin
YT-Medium mit Cam	+ 20	μg/ml	YT-Medium Chloramphenicol
YT-Medium mit Kan	+25	μg/ml	YT-Medium Kanamycin

Hefestämme	Genotyp
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, MEL1 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> [281]
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, MEL1</i> [282]

Medien für Hefen	Zusammensetzung		
SD-dropout-Medium	6,7	g	Difco™-Hefe-Stickstoff-Basis ohne AS
	2	% (w/v)	Glucose
SD-dropout-Medium mit Agar	+ 20	g/l	SD-dropout-Medium Agar

SD- <i>dropout</i> -Medium -Ade/-His/-Leu/-Trp	+ 0,6 g/l	SD- <i>dropout</i> -Medium DO-Supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp
SD- <i>dropout</i> -Medium -Leu/-Trp	+ 0,64 g/l	SD- <i>dropout</i> -Medium DO-Supplement -Leu/-Trp
SD- <i>dropout</i> -Medium -Leu	+ 0,1 g/l	SD- <i>dropout</i> -Medium -Leu/-Trp Tryptophan
SD- <i>dropout</i> -Medium -Trp	+ 0,02 g/l	SD- <i>dropout</i> -Medium -Leu/-Trp Leucin
YPDA-Medium	20 g/l 10 g/l 2 % (w/v) 0,003 % (w/v)	Difco™-Pepton Hefeextrakt Glucose Adenin
YPDA-Medium mit Agar	+ 20 g/l	YPDA-Medium Agar

Zelllinien	DSMZ/Referenz	Zelltyp
Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.		
HEK293	ACC 305	Humane embryonale Nierenzellen; isoliert aus humaner embryonaler Niere und transformiert durch ein Adenovirus Typ 5 (Ad 5); GMO-S1.  DMEM Low Glucose + 10 % FBS + 1 % L-Glutamin + 1 % Pen/Strep
HEK293T	ACC 635	Humane embryonale Nierenzellen; Derivat der Zelllinie 293 (ACC 305), das ein Plasmid mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 large T-Antigens (tsA1609neo) trägt; GMO-S1.  DMEM Low Glucose + 10 % FBS + 1 % L-Glutamin + 1 % Pen/Strep
Kasumi-1	ACC 220	Humane AML-Zellen; isoliert aus dem peripheren Blut eines 7-jährigen Japaners mit AML FAB M2 beim 2. Rezidiv nach Knochenmarkstransplantation 1989; t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO); KIT mutation N822.  RPMI 1640 + 10 % FBS

Nalm-6	ACC 128	Humane B-Vorläuferleukämiezellen; isoliert aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes mit ALL-Rezidiv 1976.  RPMI 1640 + 10 % FBS
SEM	ACC 546	Humane B-Vorläuferleukämiezellen; isoliert aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens mit ALL-Rezidiv 1990; t(4;11) MLL-AFF1 (MLL-AF4).  RPMI 1640 + 10 % FBS

Nährmedien und Zusatzstoffe für Zelllinien		Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium, Low Glucose	DMEM	PAA
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	RPMI	PAA
Fetal Bovine Serum Gold (Fetales Kälberserum)	FBS	PAA
L-Glutamin (200 mM)		PAA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Pen/Strep	PAA

### 6.1.9 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE

Alle unten aufgeführten und in dieser Arbeit für Klonierungen, Sequenzierungen sowie PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide sind als Auftragssynthesen von der Firma Eurofins (Luxemburg) bezogen worden. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben, wobei nichtbindende Elemente kleingeschrieben und bindende Abschnitte kapitalisiert angegeben, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen unterstrichen und Start- bzw. Stopcodons fett geschrieben sind.

#### 6.1.9.1 OLIGONUKLEOTIDE FÜR HEFEEXPRESSIONSVEKTOREN

MCS-Modifizierung von pGADT7 und pGBKT7	
MCS-FW	AATT <u>tgatccgaagctcagaattccccgggtcgctcgag</u> A
MCS-RV	GATCT <u>ctcgagcgaccggggaattctGaagcttcggatcc</u> A
XhoI-Deletion in pGBKT7-GAL4 BD	
XhoI-del-FW	GGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCTCGtGAAGACCTTGACATGATTTTG
XhoI-del-RV	CAAATCATGTCAAGGTCTTCaCGAGGAAAAATCAGTAGAAATAGCTGTTCC

### 6.1.9.2 OLIGONUKLEOTIDE FÜR SÄUGERZELLENEXPRESSIONSVEKTOREN

#### Modifizierung des pDF-Vektors zu pDH, pDFG und pDHC

HA-FW	<u>gata</u> tcTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCC
HA-RV	cgggg <u>tacc</u> GGCATAGTCAGGCACGTCATAAAGGATA
mCherry-FW	ccc <u>atcgat</u> gccgcc <b>ATGG</b> TGAGCAAGGGCGAGGAG
mCherry-RV	ccc <u>aagctt</u> acctttctcttctttggCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
mTAG-GFP-FW	ccc <u>atcgat</u> gccgcc <b>ATG</b> AGCGGGGGCGAGGAGC
mTAG-GFP-RV	ccc <u>aagctt</u> acctttctcttctttggCCTGTACAGCTCGTCCATGCC

### 6.1.9.3 OLIGONUKLEOTIDE FÜR AF4- BZW. AF4·MLL-MPC-KONSTRUKTE

#### Für Y2H-Experimente (pGADT7/pGBKT7) und zum Teil für Co-IP-Experimente (pDF/pDH/pDFG/pDHC)

AF4-N-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcgATTATCGCAGCCCAGTCAAG
AF4-N-RV	ccgctcgagcggTTTGGTTAATTCTTGTAGCTGCTG
AF4 1-50-FW	cggg <u>aattc</u> CTGTATTCGACTAGACAGCTCATCACC
AF4 1-50-RV	AF4-N-RV
AF4 1-100-FW	cggg <u>aattc</u> GACACTAGTGTGGAAGGAGCTGGATGG
AF4 1-100-RV	AF4-N-RV
AF4 1-150-FW	cggg <u>aattc</u> GCTTTTGGCATGGAGACTTGG
AF4 1-150-RV	AF4-N-RV
AF4 1-200-FW	cggg <u>aattc</u> GGAAGGCAAAGAGATTAAGGGAGAAAGCTC
AF4 1-200-RV	AF4-N-RV
AF5-1-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcg <b>ATGA</b> ACCGTGAAGACCGGAATGT
AF5-1-RV	ccgctcgagcggTTCCTTTTTGTAGCCTTGAGATGAT
AF5-2-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcg <b>ATG</b> TCAGAGAGTGAAAGTAGTTCCAGTGA
AF5-2-RV	ccgctcgagcggTGCAGCACTCTGCTTAGATGACTCTC
AF5-3-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcg <b>ATG</b> TCCAGCAACAGAGAGTCATCTAAG
AF5-3-RV	ccgctcgagcggGAGAATGTGTTTCAGTTCAAGATATCAA
BRD4-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcgCTAGAAATGGCAGCGGAGAG
BRD4-RV	ccgctcgagcggCGAGAAGCCCTTCATCTT
BZLF1-FW	cgcg <u>gatcc</u> <b>ATG</b> ATGGACCCAAACTCGACT
BZLF1-RV	ccgctcgagGAAATTTAAGAGATCCTCGTC
CCNT1-FW	CCNT1-1-FW
CCNT1-RV	ccgga <u>attcc</u> gg <b>TTACT</b> TAGGAAGGGGTGGAAGT
CCNT1-1-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcg <b>ATG</b> GAGGGAGAGAGGAAGAACAAC
CCNT1-1-RV	ccgga <u>attcc</u> GTGCTTCCCGTCAGTTGAG
CCNT1-2-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcgTTTAGCCTGCAGTACACACCTC
CCNT1-2-RV	ccgga <u>attcc</u> AAGCATGCAGAAGAATTGGCT
CDK9-FW	CDK9-1-FW
CDK9-RV	CDK9-3-RV
CDK9-1-FW	cgcg <u>gatcc</u> gcg <b>ATG</b> GCAAAGCAGTACGAC
CDK9-1-RV	ccgctcgagcggGCAGAAGTCGAACACCAGGTA

CDK9-2-FW CDK9-2-RV	cgcggatccgcg <b>ATGG</b> GAGATCAAGATCCTTCAGCTTTCTA ccgctcgagcggCACCTCAGGGGTGATGGAG
CDK9-3-FW CDK9-3-RV	cgcggatccgcg <b>ATGT</b> GTCATCATGGCAGAGATGT ccgctcgagcgg <b>TCAGA</b> AAGACGCGCTCAAAC
DOT1L-1-FW DOT1L-1-RV	cgcggatccgcgGAC <b>ATc</b> GGGGAGAAGCTGGAG ccgctcgagcggGGGGTTCGCAGTGTTTCATCTT
DOT1L-2-FW DOT1L-2-RV	cgcggatccgcgAAGAAGCCGTCTCCCTCCAAAG ccgctcgagcggGATCTGCAGCTCCAGGCAGT
DOT1L-3-FW DOT1L-3-RV	cgcggatccgcgGCCACGCTGTCTCGCTGGAGAAG ccgctcgagcggCCCAGAGCTGGAGGACTCAT
DOT1L-4-FW DOT1L-4-RV	cgcggatccgcgCCCGCAGGCTTCTCCTAC ccgctcgagcggGAACGTGAACAGGGAGTTCTG
E6/E7-FW E6/E7-RV	cgcggatcc <b>ATGC</b> ACCAAAAGAGAACTGCAA ccgctcgagTGGTTTCTGAGAACAGATGGG
IE1-FW IE1-RV	cgcggatcc <b>ATGG</b> GAGTCCTCTGCCAAGAGA ccgctcgagCTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT
NPM1-FW NPM1-RV	NPM1-1-FW NPM1-3-RV
NPM1-1-FW NPM1-1-RV	cgcggatccgcg <b>ATG</b> GAAGATTCGATGGACATG ccgctcgagcggTTCCTCCACAGCTACTAAGTG
NPM1-2-FW NPM1-2-RV	cgcggatccgcgGGCTTTGAAATAACACCACCA ccgctcgagcggGGCTGGAGTATCTCGTATAGATTTTC
NPM1-3-FW NPM1-3-RV	cgcggatccgcgGAAGAGGATGATGATGAAGATGAT ccgctcgagcgg <b>TTAA</b> AAGAGACTTCCTCCACTG
NSD1-1-FW NSD1-1-RV	cgcggatccgcgAGG <b>ATGG</b> ATCAGACCTGT ccgctcgagcggGAGAAGGGCTGCTTTTTTCATTG
NSD1-2-FW NSD1-2-RV	cgcggatccgcgGAGAGTAGACACGGTGCAGTCAAAT ccggaattccggCAGAAAACCTTCCTGGGGCAGTG
NSD1-3-FW NSD1-3-RV	ccggaattccggCTTGGCCTAAACTTTATCTCTGG ccggaattccggGTAAGAGAGTTCTTCAACTCGGATA
NSD1-4-FW NSD1-4-RV	ccgctcgagcggGTGGATGGTCTAAAACACTGAACAA ccgctcgagcggGTTTCATGCGCTTACGAGGTTTA
NSD1-6-FW NSD1-6-RV	cgcggatccgcgTCTAAAAAGTGCTATGAAGCTGGT ccggaattccggATAAGGTGGTGGCTTCTTGTCAT
NSD1-7-FW NSD1-7-RV	cgcggatccgcgGGAGTGGATGGGACATATAAAAAAGC ccgctcgagcggTGATTGCTCTGCCAGGTGAGT
NSD1-8-FW NSD1-8-RV	cgcggatccggcCGCGTCTGTCTTGTACTGAGCATGAC ccgctcgagcggCTGTTCTGATTCTGCACACTTGT
RelA-1-FW RelA-1-RV	cgcggatccgcg <b>ATG</b> GACGAACTGTTCCCCCTCATCTT ccgctcgagcggAGAGTTTCGGTTCCTACTCGGCAGAT
RelA-2-FW RelA-2-RV	cgcggatccgcg <b>ATG</b> CTCTGCTTCCAGGTGACAGTG ccgctcgagcggCTTGAAGGTCTCATATGTCCTTTTAC

### Für Co-IP-Experimente mit ATG, ohne Stopcodon (pDF/pDH/pDFG/pDHC)

AF4-N-IP -FW	cgcggatcc <b>ATGG</b> CAGCCCAGTCAAGTTTGTAC
AF4-N-IP -RV	ccgctcgagTCGACCCGGGAATTCTCAACTGACT
AF4 1-50-IP-FW	AF4-N-IP-FW
AF4 1-50-IP-RV	tgctctagaCTGTATTGACTAGACAGCTCATCACCTTTTGCTG
AF4 1-100-IP-FW	AF4-N-IP-FW
AF4 1-100-IP-RV	tgctctagaGACACTAGTGTGGAAGGAGCTGGATGGAATG
AF4 1-150-IP-FW	AF4-N-IP-FW
AF4 1-150-IP-RV	tgctctagaGCTTTTGGCATGGAGACTTGGCATTGGTTGAG
AF4 1-200-IP-FW	AF4-N-IP-FW
AF4 1-200-IP-RV	tgctctagaGGAAGGCAAAGAGATTAAGGGAGAAAGCTC
CCNT1-FW	CCNT1-1-FW (s. o.)
CCNT1-IP-RV	tgctctagaCTTAGGAAGGGTGGAAAGTGGTGGAGGA
CCNT1-1-FW	CCNT1-1-FW (s. o.)
CCNT1-1-IP-RV	tgctctagaGTGCTTCCCGTCAGTTGAGACTGGGATC
CCNT1-2-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> TTTAGCCTGCAGTACACACCTC
CCNT1-2-IP-RV	tgctctagaAGCCAATTCTTCTGCATGCTTCGCGCGGT
CDK9-FW	CDK9-FW (s. o.)
CDK9-IP-RV	ccgctcgagcggGAAGACGCGCTCAAACCTCC
CDK9-3-FW	CDK9-3-FW (s. o.)
CDK9-3-IP-RV	CDK9-IP-RV
DOT1L-1-IP-FW	cgcggatcccgcgac <b>ATG</b> GGGGAGAAGCTGGA
DOT1L-1-RV	DOT1L-1-RV (s. o.)
DOT1L-2-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> AAGAAGCCGTCTCCCTCAAAGC
DOT1L-2-RV	DOT1L-2-RV (s. o.)
DOT1L-3-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> GCCACGCTGTCGCTGGAGAAG
DOT1L-3-RV	DOT1L-3-RV (s. o.)
DOT1L-4-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> CCCGCAGGCTTCTCCTACG
DOT1L-4-RV	DOT1L-4-RV (s. o.)
NSD1-2-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> GAGAGTAGACACGGTGCAGTCAAAT
NSD1-2-IP-RV	tgctctagaCGGCAGAAAACCTTCTGGGGCAGTGTTG
NSD1-3-IP-FW	tgctctaga <b>ATG</b> CTTGGCCTAAACTTTATCTCTGGGGATATATCTG
NSD1-3-IP-RV	gatacGTAAGAGAGTTCTTCAACTCGGATAAAACATGTTTCAC
NSD1-4-IP-FW	ccgctcgag <b>ATG</b> GTGGATGGTCTAAAACACTGAACAATATGC
NSD1-4-IP-RV	NSD1-4-RV (s. o.)
NSD1-6-IP-FW	cgcggatcc <b>ATG</b> TCTAAAAAGTGCTATGAAGCTGGTCAC
NSD1-6-IP-RV	tgctctagaCGGATAAGGTGGTGGCTTCTTGTCAATTCTTTG

### 6.1.9.4 OLIGONUKLEOTIDE FÜR PHD- UND CYP33-KONSTRUKTE

Für Y2H-Experimente (pGADT7/pGBKT7)	
PHD3-FW	cgcGGATCCACAACCTCCAGGCCAAAGGGTGG
PHD3-RV	cggctcgagttaGCCGGTAGCGTAGCAAATGG
PHD3-Linker-FW	gatccACCAAGTGTGTTTCGCTGTAAGAGCTGTg
PHD3-Linker-RV	gatccACAGCTCTTACAGCGAACACACTTGGTg
PHD3-0-I-FW	PHD3-FW (s. o.)
PHD3-0-I-RV	cggctcgagttaATCTCATAATCTCATCTTCTGTACCTG
PHD3-0-II-FW	cgcggatccCAGGTACAGAAGATGAGATGTATGAGAT
PHD3-0-II-RV	PHD3-RV (s. o.)
PHD3-3-I-FW	PHD3-FW (s. o.)
PHD3-3-I-RV	cggctcgagttaCTCATAATCTCATCTGAAAGATTCTCA
PHD3-3-II-FW	cgcggatccTGAGAATCTTTCAGATGAGATGTATGAGAT
PHD3-3-II-RV	PHD3-RV (s. o.)
PHD3-11-I-FW	PHD3-FW (s. o.)
PHD3-11-I-RV	cggctcgagttaGTAGGCCACACTTTCTTCTGTAC
PHD3-11-II-FW	cgcggatccAGGTACAGAAGAAAGTGTGGCCTAC
PHD3-11-II-RV	PHD3-RV (s. o.)
PHD3-14-I-FW	PHD3-FW (s. o.)
PHD3-14-I-RV	cggctcgagttaGCCACACTTTCTGAAAGATTCTCACA
PHD3-14-II-FW	cgcggatccAGAATCTTTCAGAAAGTGTGGCCTAC
PHD3-14-II-RV	PHD3-RV (s. o.)
PHD1-3A-FW	cccgggGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGG
PHD1-3A-RV	PHD3-RV (s. o.)
PHD1-3B-FW	cccgggTTTGTGTATTGCCAAGTCTGTTGTGA
PHD1-3B-RV	PHD3-RV (s. o.)
CYP33full-FW	CYP33full-IP-FW (s. u.)
CYP33full-RV	CYP33full-IP-RV (s. u.)
CYP33RRM-FW	cgcggatccGCCACCACCAAGCGCGTC
CYP33RRM-RV	cggctcgagttaGGCCAAATTGACACGAATTGTACG
Für Co-IP-Experimente mit ATG, ohne Stopcodon (pDF/pDH) Bei CYP33-Konstrukten auch für pDFG/pDHC	
PHD3-IP-FW	cccaagcttatgACCAAGTGTGTTTCGCTGTAAGAGCTGTGGATCCA
PHD3-IP-RV	cggCTCGAGctGCCGGTAGCGTAGCAAATGG
PHD1-3A-IP-FW	cccaagcttatgGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGAT
PHD1-3A-IP-RV	PHD3-IP-RV (s. o.)
PHD1-3B-IP-FW	cccaagcttatgTTTGTGTATTGCCAAGTCTGTTGTGAGCCCTTC
PHD1-3B-IP-RV	PHD3-IP-RV (s. o.)
CYP33full-IP-FW	cgcggatccATGGCCACCACCAAGCGCGTCTTGTACGT
CYP33full-IP-RV	cggctcgagCACGTAATCCCCACAGTCGGCGATGATCA
CYP33RRM-IP-FW	cgcGGATCCatgGCCACCACCAAGCGCGTC
CYP33RRM-IP-RV	cggCTCGAGGGCCAAATTGACACGAATTGTACG

**Für Co-IP-Experimente mit ATG, ohne Stopcodon (pDFG/pDHC)**

PHD3-IP2-FW	ttg <b>cggccgca</b> ATGACCAAGTGTGTTTCGCTGTAAGAGCTGTGGATC
PHD3-IP2-RV	tgctctagaCTGCCGGTAGCGTAGCAAATGGCTGGTAGT
PHD1-3A-IP2-FW	ttg <b>cggccgca</b> ATGGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGAT
PHD1-3A-IP2-RV	PHD3-IP2-RV (s. o.)
PHD1-3B-IP2-FW	ttg <b>cggccgca</b> ATGTTTGTGTATTGCCAAGTCTGTTGTGAGCCCTTC
PHD1-3B-IP2-RV	PHD3-IP2-RV (s. o.)

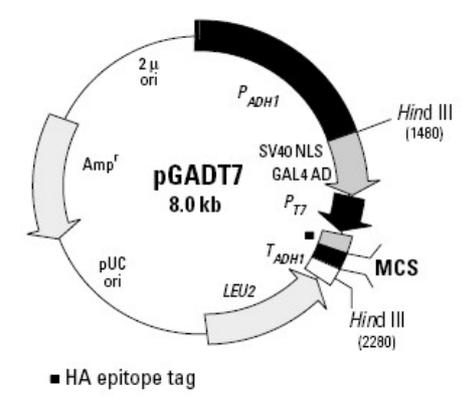
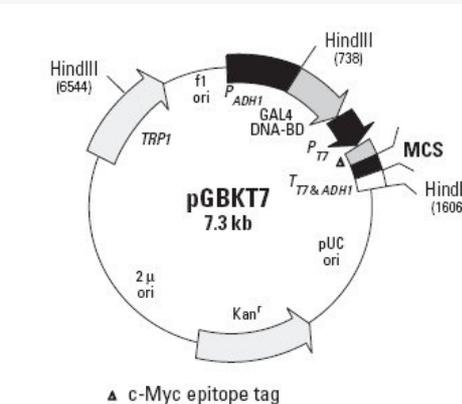
**6.1.9.5 WEITERE OLIGONUKLEOTIDE**

**Allgemeine Oligonukleotide**

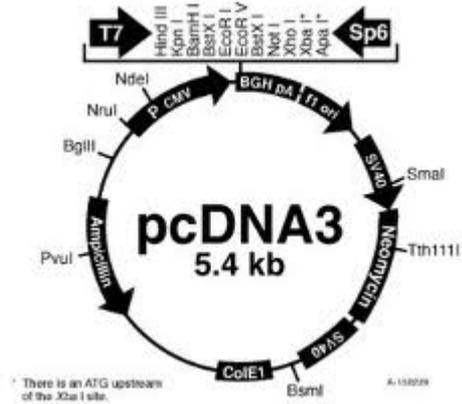
T7	TAATACGACTCACTATAGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
GAPDH-FW	CTTCACCACCATGGAGGAAGG
GAPDH-RV	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

**6.1.10 PLASMIDVEKTOREN**

**6.1.10.1 EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR HEFEZELLEN**

Name	Beschreibung
pGADT7	 <p>Expressionsvektor für Hefezellen des Matchmaker Y2H-Systems (Clontech)</p> <p>für Expression des POI-GAL4 AD-Fusionsproteins</p>
pGADT7.1	pGADT7 mit modifizierter MCS: <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI- <i>Xma</i> I- <i>Sma</i> I- <i>Xho</i> I- <i>Sml</i> I
pGBKT7	 <p>Expressionsvektor für Hefezellen des Matchmaker Y2H-Systems (Clontech)</p> <p>für Expression des POI-GAL4 BD-Fusionsproteins</p>
pGBKT7.2	pGBKT7 mit modifizierter MCS: <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI- <i>Xma</i> I- <i>Sma</i> I- <i>Xho</i> I- <i>Sml</i> I

### 6.1.10.2 EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR SÄUGERZELLEN

Name	Beschreibung
pcDNA	 <p>Expressionsvektor für Säugerzellen (Invitrogen)</p>
pDF	<p>Modifizierter pcDNA3-Vektor:            Neue MCS einkloniert über <i>HindIII/ApaI</i>            (<i>Clal-SacII-HindIII-BamHI-EcoRI-NotI-XhoI-XbaI-EcoRV-KpnI</i>-TGA(Stop));            C-terminaler FLAG®-tag einkloniert über <i>EcoRV/KpnI</i>.            Expression eines Proteins mit C-terminalem FLAG®-tag.            Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bastian Scholz, ehemals Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.</p>
pDH	<p>Modifizierter pDF-Vektor:            FLAG®-tag ersetzt durch HA-tag über <i>EcoRV/KpnI</i>.            Expression eines Proteins mit C-terminalem HA-tag.</p>
pDFG	<p>Modifizierter pDF-Vektor:            Kozak-Sequenz, mTAG-GFP und NLS einkloniert über <i>Clal/HindIII</i>.            Expression eines Proteins mit N-terminalem GFP und C-terminalem FLAG®-tag.</p>
pDHC	<p>Modifizierter pDH-Vektor:            Kozak-Sequenz, mCherry und NLS einkloniert über <i>Clal/HindIII</i>.            Expression eines Proteins mit N-terminalem mCherry und C-terminalem HA-tag.</p>

### 6.1.11 ANTIKÖRPER

Primärantikörper	Für WB	Beschreibung	Bezugsquelle
Anti-β-Actin (I-19)-R	1:1.000	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ein C-terminales Peptid des humanen Aktin	Santa Cruz (sc-1616-R)
Anti-FLAG® M2	1:1.000	Maus IgG1 monoklonaler Antikörper gegen Fusionsproteine mit FLAG®-Peptidsequenz (DYKDDDDK)	Sigma (F1804-1MG)
Anti-HA [HA-7]	1:5.000	Maus monoklonaler [HA-7] Antikörper gegen Fusionsproteine mit N- oder C-terminalem HA-tag, das Hemagglutinin AS 96-108 des Influenza A Virus (YPYDVPDYA)	Abcam (ab49969)

Anti-IgG	-	Kaninchen IgG als Kontrollimmunglobulin für Negativkontrollen	Santa Cruz (sc-2027)
Sekundärantikörper	Verdünnung für WB	Beschreibung	Bezugsquelle
Die Sekundärantikörper sind gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (HRP-Konjugate).			
Anti-mouse	1:10.000	Antikörper gegen Maus-IgG	GE Healthcare
Anti-rabbit	1:10.000	Antikörper gegen Kaninchen-IgG	GE Healthcare

## 6.2 METHODEN

### 6.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die unten aufgeführten Methoden nach Herstellerangaben oder gängigen Standardprotokollen (vgl. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* von Sambrook et al., 2000/2012) durchgeführt..

- Agarosegelelektrophorese
- Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase (NEB)
- DNA-Aufreinigung nach PCR (Qiagen)
- DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Qiagen)
- DNA-Ligation mit T4-DNA-Ligase (NEB)
- DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Herstellung CaCl<sub>2</sub>- und elektrokompetenter *Escherichia coli*
- Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide
- Nukleinsäurefällung vor Sequenzierung
- PCR-Analysen
- pGEMT-Klonierung (Promega)
- Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden (NEB)
- Photometrische DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung
- Plasmid-DNA-Isolierung aus *Escherichia coli* (Promega)
- Plasmid-DNA-Minilysatpräparation aus *Escherichia coli* nach der *boiled-lysis* Methode [283] und durch Alkalische Lyse
- Reverse Transkription mit Reverser Transkriptase (Invitrogen)
- RNA-Extraktion aus Säugerzellen (Qiagen)
- Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *Escherichia coli*
- Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli*
- Western Blot mit *Semidry* Blot System

### **6.2.1.1 SEQUENZANALYSEN**

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit entsprechend des Herstellerprotokolls. Die zugrunde liegende Kettenabbruchsynthese [284] erlaubt die Sequenzierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA im ABI Prism 310 Genetic Analyzer basierend auf der Markierung der vier ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzsignalen und anschließender elektrophoretischer Trennung.

## **6.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN - ARBEITEN MIT HEFEN**

### **6.2.2.1 LIAC-TRANSFORMATION VON HEFEZELLEN IN KLEINEM MAßSTAB**

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde 1 ml YPDA-Medium mit im Durchmesser 2-3 mm großen Hefekolonien des Hefestamms AH109 bzw. Y187 inokuliert, resuspendiert und in 20 ml YPDA-Medium überführt. Die Inkubation dieser 20 ml-Kultur erfolgte 16-18 h über Nacht bei 30 °C und 250 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase entsprechend einer  $OD_{600} > 1,5$ .

Nach Kontrolle der  $OD_{600}$  am nächsten Tag wurden ca. 5 ml der Übernachtskultur in 50 ml YPDA-Medium überführt, sodass eine  $OD_{600}$  von 0,2-0,3 erreicht wurde. Durch erneute Inkubation für 3 h bei 30 °C und 230 rpm wurde eine  $OD_{600}$  von 0,4-0,6 erzielt. Zum Pelletieren der Hefezellen wurde 10 min bei 1.000 rpm und RT in sterilen 50 ml-Zentrifugengefäßen zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 20 ml 1x TE-Puffer gewaschen, erneut 10 min bei 1.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Schließlich wurde das Pellet in 1,5 ml frisch hergestellter 1x TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

Für jede Transformation wurden jeweils 100 µg Yeastmaker™ Carrier DNA nach 20-minütigem Aufkochen sowie 1 µg des gewünschten Plasmids bzw. bei Kotransformationen jeweils 1 µg beider Plasmide vorgelegt. Zu jedem DNA-Mix wurden 100 µl der oben hergestellten Zellsuspension zugegeben, kurz gemischt, 600 µl frisch angesetzter PEG/LiAc-Lösung zugefügt und erneut gemischt, bevor für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert wurde. Dann wurden 70 µl DMSO dazugegeben, durch Invertieren gemischt und ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach 2 min auf Eis wurde bei 14.000 rpm und RT für 5 s zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen während das Pellet in 300 µl 1x TE-Puffer resuspendiert wurde. Davon wurden 100 µl auf entsprechenden SD-

*dropout*-Agarplatten ausgebracht und diese für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert bis zum Auftreten selektionierter Kolonien.

### **6.2.2.2 YEAST MATING**

Das *Mating* von Hefezellen ist eine konventionelle Methode um zwei verschiedene Plasmide in gleiche Zellen einzuschleusen alternativ zur Kotransformation. [285] [282] [286].

Für das *Mating* werden Hefestämme benötigt, die das gewünschte Plasmid tragen. Dazu müssen die zu testenden *Mating*-Partner einzeln als Plasmide in kompetente Hefezellen transformiert und auf entsprechenden *SD-dropout*-Agarplatten selektioniert werden.

Die entsprechenden Kolonien wurden von *SD-dropout*-Agarplatten gepickt, die nicht älter als 2 Monate alt waren, in jeweils 500 µl YPDA-Medium dispensiert und gut resuspendiert. In 96-*well*-Gewegekulturschalen wurden jeweils 20 µl beider *Mating*-Partner gemischt und für mindestens 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl dieser Mischung auf 2xDO-Agarplatten ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert bis zum Erscheinen sichtbarer Kolonien.

Die Kolonien von den 2xDO-Agarplatten wurden gepickt, in 100 µl MQ dispensiert und gut resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl auf 4xDO-Agarplatten ausgebracht und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

## **6.2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN - ARBEITEN MIT SÄUGERZELLEN**

### **6.2.3.1 PEI-TRANSFEKTION VON HEK293T-ZELLEN**

Für die Transfektion von HEK293T-Zellen wurden 24 h vorher entsprechend einer etwa 50%igen Konfluenz ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen auf einer 15 cm- bzw. ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen auf einer 10 cm-Gewegekulturschale mit 20 ml bzw. 10 ml Medium ausgebracht.

Das Medium wurde 1-2 h vor der Transfektion durch Medium ohne die Zusätze FBS, Glu und Pen/Strep ersetzt. Die Transfektionslösung bestand aus den zwei Komponenten Lösung A und Lösung B entsprechend Tabelle 6-1. Bei Kotransfektionen wurde die gleiche Gesamt-DNA-Menge eingesetzt, wobei die beiden verwendeten Plasmide in gleichen Anteilen verwendet wurden. Lösung B wurde unter permanentem Mischen tröpfchenweise in Lösung A pipettiert, die Transfektionslösung nach 15 min Inkubationszeit gleichmäßig auf den Zellen verteilt und die Zellen anschlie-

Bend für 48 h inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und durch Medium mit Zusätzen ersetzt.

**Tabelle 6-1: Zusammensetzung der PEI-Transfektionslösung**

Gewebekulturschale	Lösung A	Lösung B
Ø 10 cm	180 µl PBS + 36 µl PEI (10 mM)	180 µl PBS + 10 µg DNA
Ø 15 cm	450 µl PBS + 90 µl PEI (10 mM)	450 µl PBS + 25 µg DNA

### 6.2.3.2 PROTEASOMINHIBIERUNG IN HEK293T-ZELLEN

Um die Degradation ubiquitylierter Proteine zu reduzieren, wurde der Proteasominhibitor MG-132 ca. 30 h nach der Transfektion entsprechend Kapitel 6.2.3.1 gleichmäßig auf den Zellen verteilt, wobei für Gewebekulturschalen Ø15 cm 3 µl und für Gewebekulturschalen Ø10 cm 1,2 µl einer Lösung mit der Konzentration 5 mg/300 µl eingesetzt wurden.

### 6.2.3.3 HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion entsprechend Kapitel 6.2.3.1 mithilfe von Zellschabern von den Gewebekulturschalen gelöst, in PBS aufgenommen und in 15 ml-Falcons 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Wenn die Lyse nicht direkt erfolgte, wurden die Pellets bei -20 °C eingefroren.

Im Folgenden wurden die Pellets in frisch angesetzttem Lysispuffer entsprechend Tabelle 6-2 resuspendiert. Die Lyse wurde für 1 h unter ständigem Rotieren bei 4 °C durchgeführt bevor 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand, das Zelllysate, wurde anschließend in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bei nicht sofortiger Verwendung der Zelllysate wurden diese bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 6-2: Volumen Lysispuffer für eine Gewebekulturschale**

Gewebekulturschale	Lysispuffer
Ø 10 cm	250 µl
Ø 15 cm	100 µl

### 6.2.3.4 (Ko)IMMUNPRÄZIPITATION

Für die (Ko)Immunpräzipitation (IP bzw. CoIP) wurden jeweils 2 Gewebekulturschalen Ø15 cm für jedes Experiment und jeden Antikörper mittels PEI-Transfektion mit den zu testenden Plasmiden transfiziert wie Kapitel in 6.2.3.1 beschrieben. Die Herstellung des Zelllysats erfolgte entsprechend Kapitel 6.2.3.3.

Zu Beginn wurde dem Zelllysats ein Aliquot von ca. 40 µl als Inputprobe entnommen, mit der gleichen Menge 2x-Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Das Zelllysats wurde mit 5 µl ProteinG-Agarose pro Gewebekulturschale für 30 min bei 4 °C rotierend vorgeklärt, 5 min bei 2.500 rpm zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Anschließend wurde das Zelllysats in so viele Aliquots aufgeteilt, dass für jeden Antikörper inklusive des IgG-Antikörpers als Negativkontrolle ein Reaktionsgefäß vorhanden war. Jedem Aliquot wurden 0,5-2 µg Antikörper zugegeben und dann für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Dann wurden jedem Aliquot 25 µl ProteinG-Agarose zugefügt und für weitere 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert bevor 5 min bei 2.500 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde, wobei der Überstand verworfen wurde. Die Pellets wurden im Folgenden mit jeweils 500 µl PBS gewaschen, 5 min bei 2.500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieses Waschen der Pellets wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Zur Elution wurden jeweils 75 µl 2x-Lämmli-Puffer auf das Pellet gegeben, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und 5 min bei 2.500 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für SDS-PAGE- und Western Blot-Experimente verwendet bzw. bei -20 °C eingefroren.

Während von den Proben für SDS-PAGE und Western Blot jeweils 15 µl aufgetragen wurden, waren es nur 5 µl Proteinmarker.

**Tabelle 6-3: Antikörper für die CoIP und ihre Konzentrationen**

Antikörper	Konzentration	Eingesetztes Volumen
Anti-Flag®	1 µg/µl	1 µl
Anti-IgG	0,4 µg/µl	2 µl

## 7 ABKÜRZUNGEN

Ø	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
% (m/v)	Massenprozent
% (v/v)	Volumenprozent
2xDO	2x dropout (-Leu/-Trp)
4xDO	4x dropout (-Ade/-His/-Leu/-Trp)
7SK snRNA	7SK small nuclear RNA Syn.: 7SK
A/mA	Ampere/Milliampere
AS	Aminosäuren
ad	Adde (Fülle auf)
Ade	Adenin
AEP	AF4 family/ENL family/P-TEFb complex
AF4	ALL-1 fused gene from chromosome 4 Syn.: AFF1, MLLT2, PBM1
AF5	ALL-1 fused gene from chromosome 5q31 Syn.: AFF4, MCEF; AF5q31
AF9	ALL-1 fused gene from chromosome 9 Syn.: MLLT3, YEATS3
AF10	ALL-1 fused gene from chromosome 10 Syn.: MLLT10
AFF1	AF4/FMR2 family member, 1
ALF	AF4/LAF4/FMR2 homology domain
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxodisulfat Syn.: Ammoniumpersulfat (APS)
ASB2	Ankyrin repeat and Suppressor of cytokine signaling (SOCS) box-containing protein 2
ASH2L	(Abesnt, Small, Or Homeotic)-Like ( <i>Drosophila</i> )

BCR	Breakpoint cluster region
BD	Bromodomäne
(DNA-)BD	DNA-Bindedomäne
bp	Basenpaare
BRD4	Bromodomain containing 4 Syn.: CAP; MCAP; HUNK1; HUNKI
BRLF1	HHV4_BRLF1 (IE-Protein Rta)
BZLF1	HHV4_BZLF1 (IE-Protein Zta)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bZIP	Leucin-Zipper-Domäne
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Cam	Chloramphenicol
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1 Syn.: PRMT4
CBP	CREB-Binding Protein
CCNT1	Cyclin T1 Syn.: CCNT; CYCT1; HIVE1
CHD	C-terminal homology domain
CoIP	Koimmunpräzipitation
CDK9	Cyclin-dependant kinase 9 Syn.: TAK; C-2k; CTK1; CDC2L4; PITALRE
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) Syn.: KIP1, MEN4, CDKN4, MEN1B, P27KIP1
CLP	Common lymphoid progenitors
CREB	Cyclic AMP Response Element-Binding protein
CtBP	C-terminal Binding Protein
CTD	C-terminal homology domain
CYP33	Cyclophilin 33 (Syn. PPIE)
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphos-

	phat
der4	Derivatchromosom 4
der11	Derivatchromosom 11
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DO	<i>Dropout</i>
DOT1L	<i>DOT1-like histone H3K79 methyltransferase</i> Syn.: DOT1, KMT4
DTT	Dithiothreitol
E	<i>(delayed) early</i>
E6	<i>Transforming protein</i> (HPV16)
E7	<i>Transforming protein</i> (HPV16)
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i> Syn.: RBP3; E2F-1; RBAP1; RBBP3
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPHA7	<i>Ephrin receptor A7</i>
ELK1	<i>Member of ETS oncogene family</i>
ELL	<i>Elongation factor RNA polymerase II</i> Syn.: MEN; ELL1; PPP1R68; C19orf17
ENL	<i>Eleven-nineteen-leukemia gene</i> Syn.: MLLT1, LTG19, YEATS1
ePHD	<i>Extended PHD</i> (Erweiterte PHD)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> Syn.: MAPK1 u. a.
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
FMR2	<i>Fragile mental retardation 2</i> Syn.: AFF2, MRX2, OX19,

	FMR2P, FRAXE
FW	Forward Primer
g/kg/µg/ng	Gramm/Kilogramm/ Mikrogramm/Nanogramm
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
GAL4-AD	Gal4-Aktivierungsdomäne
GAL4-BD	Gal4-DNA-Bindungsdomäne
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Grün fluoerszierendes Protein)
GMO	<i>Genetically modified organism</i> (Genetisch modifizierter Organismus)
h	<i>Hour</i> (Stunde)
HA	Hämagglutinin
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Borsäure
HCF	<i>Host cell factor</i>
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Zytomegalievirus (HHV-5)
HDAC	Histondeactylasen
His	Histidin
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> (Humane embryonale Niere)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEXIM1	<i>hexamethylene bis-acetamide inducible 1</i> Syn.: CLP1; EDG1; HIS1; MAQ1
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMG	<i>High mobility group</i>
HMT	Histonmethyltransferase
HPV	Humanes Papillomvirus
HOX	<i>Homeobox</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme

IE	<i>Immediate early</i>
IE1	<i>Enhances activation by IE2; interacts with basal transcriptional machinery and cellular transcription factor; disrupts ND10; involved in gene regulation</i> Syn.: UL123
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	<i>late</i>
l/ml/μl	Liter/Milliliter/Mikroliter
LAF4	<i>Lymphoid nuclear gene related to AF4</i> Syn.: AFF3, MLLT2-like
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lilli	<i>Drosophila melanogaster lilliputian-Gen</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
mol/mmol	Mol/Millimol
M/mM/μM/nM	Molar/Millimolar/Mikromolar/Nanomolar
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> (Multiple Klonierstelle)
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MEIS1	<i>MEIS homeobox 1</i>
min	Minute
miRNA	MicroRNA
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i> Syn.: KMT2A, ALL-1, CXXC7, HRX, HTRX1, MLL1A, TRX1
MLLT2	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax (Drosophila) homolog); translocated to, 2</i>

MOF	<i>Males-absent on the first</i>
MPC	Multiproteinkomplex
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MQ	Reinstwasser durch Millipore-Reinstwassersystem
MRD	<i>Minimal residual disease</i> (Minimale Resterkrankung)
MT	Methyltransferase
MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N	Äquivalentkonzentration (C <sub>eq</sub> )/Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NFκB1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i> Syn.: p50; KBF1; p105; EBP-1; NF-κB1; NFKB-p50; NFKappaB; NF-kappaB; NFKB-p105; NF-kappa-B
NHD	<i>N-terminal homology domain</i>
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
NPM1	<i>Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)</i> Syn.: B23; NPM
NSD1	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein 1</i> Syn.: STO; KMT3B; SOTOS; ARA267; SOTOS1
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAF1	<i>Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (S. cerevisiae)</i> Syn.: PD2; F23149_1

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i> Syn.: TP53; P53; BCC7; LFS1; TRP53	RbBP5	<i>Retinoblastoma Binding Protein 5</i>
PBM1	<i>Pre-B-cell monocytic leukemia partner 1</i>	RELA	<i>V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i> Syn.: p65; NFkB3
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)	RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
PcG	<i>Polycomb Group</i>	RT	Raumtemperatur
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)	RV	Reverse Primer
pDF/pDH	Modifizierter pcDNA-Vektor mit FLAG®- bzw. HA-tag	rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
pDFG	Modifizierter pcDNA-Vektor mit mTAG-GFP und FLAG®-tag	RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
pDHC	Modifizierter pcDNA-Vektor mit mCherry und HA-tag	RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
PEG	Polyethylenglykol	s	Sekunde
PEI	Polyethylenimin	s. o.	Siehe oben
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	s. u.	Siehe unten
PHD	<i>Plant homeodomain</i>	S1	Biologische Schutzstufe S1
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	SD	<i>Synthetic Dextrose</i> (Definiertes Minimalmedium für Hefen)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
POI	<i>Protein of interest</i> (Zu untersuchendes Protein)	SEC	Superelongationskomplex
Pol II	RNA-Polymerase II	SET	<i>Suppressor of variegation (Su(var)3–9), Enhancer of zeste, and Trithorax</i>
Pol E	Elongierende Pol II	SIAH	<i>Seven in absentia homolog</i>
Pol O	In Promotornähe arretrierte Pol II	siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
PPIE	Peptidylprolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase E (Syn. CYP33)	SNL	<i>Speckled nuclear localization</i> (Punktuelle Kernlokalisierung)
pRB	<i>Retinoblastoma 1</i> Syn.: RB1; RB; OSRC; pp110; p105-Rb; PPP1R130	snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>
pSer	<i>Homology domain containing high number of serines</i>	SEC	<i>Super elongation complex</i>
PTD	<i>Partial tandem duplication</i>	SOB	<i>Super Optimal Broth</i> (Medium für Bakterien)
P-TEFb	<i>Positive transcription elongation factor b</i> (CCNT1 + CDK9)	TAD	<i>Transactivation Domain</i> (Transaktivierungsdomäne)
POU	3 Transkriptionsfaktoren: <i>Pit-1, Oct-1/Oct-2, Unc-68</i>	t-AML	<i>Therapy-related/-induced AML</i> (Therapieinduzierte AML)

Tat	<i>Transactivator of transcription</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Trisgepufferte Salzlösung)
TE	Tris-HCl EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TERT	<i>Telomerase reverse transcrip- tase</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TPG	Translokationspartner gene
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Trp	Tryptophan
<i>trx</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>trithorax</i>
TrxG	<i>Trithorax Group</i>
U	<i>Unit</i> (Einheit)
u. a.	Unter anderem
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>

UV	Ultraviolettstrahlung
V/kV	Volt/Kilovolt
vgl.	Vergleiche
WB	Western Blot
WDR5	<i>WD repeat domain 5</i>
wt	Wildtyp
WT1	<i>Wilms tumor susceptibility gene</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D- galactopyranosid
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
YPDA	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> <i>Adenin</i>
YT	<i>Yeast extract and Tryptone</i> (Medium für Bakterien)
z. B.	Zum Beispiel
ZF	Zinkfinger

---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] GEKID, „Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.“ [Online]. Available: [www.gekid.de/](http://www.gekid.de/). [Zugriff am 14 April 2014].
- [2] RKI, „Robert Koch-Institut.“ [Online]. Available: [www.rki.de/](http://www.rki.de/). [Zugriff am 14 April 2014].
- [3] ZfKD (RKI), „Zentrum für Krebsregisterdaten.“ [Online]. Available: [www.krebsdaten.de/](http://www.krebsdaten.de/). [Zugriff am 14 April 2014].
- [4] ZfKD (RKI) und GEKID, „Krebs in Deutschland.“ Berlin, 2013.
- [5] Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage Hrsg., Berlin: Walter de Gruyter, 1994.
- [6] DIMDI (BMG), „Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information (Bundesministerium für Gesundheit).“ [Online]. Available: [www.dimdi.de/](http://www.dimdi.de/). [Zugriff am 14 April 2014].
- [7] R. Marschalek, I. Zündorf und T. Dingermann, „Leukämie - Eine hochmaligne Erkrankung.“ *Pharmazie in unserer Zeit*, Nr. 3, pp. 186-189, 2012.
- [8] A. Tefferi, "The history of myeloproliferative disorders before and after Dameshek," *Leukemia*, pp. 3-13, 2008.
- [9] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan, "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.," *British Journal of Haematology*, vol. 33, no. 4, pp. 451-8, August 1976.
- [10] S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele and J. W. Vardiman, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, 2 ed., Lyon: International Agency for Research on Cancer (WHO), 2008.
- [11] M. C. Bene, G. Castoldi, W. Knapp, W. D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao and M. B. van't Veer, "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).," *Leukemia*, vol. 9, no. 10, pp. 1783-6, October 1995.
- [12] DKKR, „Deutsches Kinderkrebsregister.“ IMBEI / Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, [Online]. Available: [www.kinderkrebsregister.de/](http://www.kinderkrebsregister.de/). [Zugriff am 14 April 2014].
- [13] H. Satzinger, "Theodor and Marcella Boveri: chromosomes and cytoplasm in heredity and development," *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, pp. 231-238, March 2008.
- [14] A. Balmain, "Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays," *Nature Reviews Cancer*, vol. 1, pp. 77-82, October 2001.
- [15] J. Pedersen-Bjerggaard, M. K. Andersen, M. T. Anderesen and D. H. Christiansen, "Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia," *Leukemia*, vol. 22, pp. 240-248, January 2008.
- [16] K. Deguchi and D. G. Gilliland, "Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML," *Leukemia*, vol. 16, pp. 740-744, April 2002.
- [17] J. Groffen, J. R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C. R. Bartram und G. Grosveld, „Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22,“ *Cell*, Bd. 36, Nr. 1, pp. 93-99, January 1984.
- [18] Y. Gu, G. Cimino, H. Alder, T. Nakamura, R. Prasad, O. Canaani, D. T. Moir, C. Jones, P. C. Nowell and C. M. Croce, "The (4;11) (q21;q23) chromosome translocations in acute leukemias involve the VDJ recombinase," *PNAS*, vol. 89, pp. 10464-10468, November 1992.
- [19] J. Pedersen-Bjerggaard and J. D. Rowley, "The Balanced and the Unbalanced Chromosome Aberrations of Acute Myeloid Leukemia May Develop in Different Ways and May Contribute Differently to Malignant Transformation," *Blood*, vol. 83, no. 10, pp. 2278-2286, May 1994.
- [20] R. Marschalek, I. Nilson, K. Löchner, R. Greim, G. Siegler, J. Greil, J. D. Beck and G. H. Fey,
-

- "The Structure of the Human ALL-1/MLL/HRX Gene," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 27, no. 5-6, pp. 417-428, 1997.
- [21] M. Reichel, E. Gillert, I. Nilson, G. Siegler, J. Greil, G. H. Fey and R. Marschalek, "Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation," *Oncogene*, vol. 23, pp. 3035-3044, December 1998.
- [22] M. Reichel, E. Gillert, I. Breitenlohner, R. Repp, J. Greil, J. D. Beck, G. H. Fey and R. Marschalek, "Rapid Isolation of Chromosomal Breakpoints from Patients with t(4;11) Acute Lymphoblastic Leukemia," *Cancer Research*, vol. 59, pp. 3357-3362, July 1999.
- [23] E. Gillert, T. Leis, R. Repp, M. Reichel, A. Hösch, I. Breitenlohner, S. Angermüller, A. Borkhardt, J. Harbott, F. Lampert, F. Griesinger, J. Greil, G. H. Fey and R. Marschalek, "A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells," *Oncogene*, vol. 18, no. 33, pp. 4663-71, August 1999.
- [24] T. H. Rabbitts, "Chromosomal translocations in human cancer," *Nature*, vol. 372, pp. 143-149, November 1994.
- [25] A. T. Look, "Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias," *Science*, vol. 278, no. 5340, pp. 1059-1064, November 1997.
- [26] R. Marschalek, "Genetic basis of leukemia: Serious consequences of chromosomal translocations," *Pharmazie in unserer Zeit*, vol. 41, no. 3, pp. 190-195, May 2012.
- [27] F. Albano, A. Zagaria, L. Anelli, N. Coccaro, L. Impera, C. F. Minervini, A. Minervi, A. R. Rossi, G. Tota, P. Casieri and G. Specchia, "Gene expression profiling of chronic myeloid leukemia with variant t(9;22) reveals a different signature from cases with classic translocation," *Molecular Cancer*, vol. 12, no. 36, May 2013.
- [28] E. Jabbour and H. Kantarjian, "Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring and management," *American Journal of Hematology*, vol. 89, no. 5, pp. 547-556, May 2014.
- [29] M. Hallek, "Signaling the End of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies," *Blood*, vol. 122, no. 23, pp. 3723-34, November 2013.
- [30] P. Baliakas, M. Iskas, A. Gardiner, Z. Davis, K. Plevova, F. Nguyen-Khac, J. Malcikova, A. Anagnostopoulos, S. Glide, S. Mould, K. Stepanovska, M. Brejcha, C. Belessi, F. Davi, S. Pospisilova, A. Athanasiadou, K. Stamatopoulos and D. Oscier, "Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data," *American Journal of Hematology*, vol. 89, no. 3, pp. 249-255, March 2014.
- [31] E. M. Ross, R. Mahfouz, M. Onciu, H.-C. Liu, X. Zhou, A. S. Shurtleff, S. Pounds, C. Cheng, J. Ma, R. C. Ribero, J. E. Rubnitz, K. Girtmann, W. K. Williams, S. C. Raimondi, D.-C. Liang, L.-Y. Shih, C.-H. Pui and J. R. Downing, "Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia," *Blood*, vol. 104, no. 12, pp. 3679-3687, December 2004.
- [32] K. Döhner and H. Döhner, "Molecular characterization of acute myeloid leukemia," *Haematologica*, vol. 93, no. 7, pp. 976-982, 2008.
- [33] C.-H. Pui, W. L. Carroll, S. Meshinchi and R. J. Arceci, "Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 5, pp. 551-565, February 2011.
- [34] H. Choi, C. Jung, S. K. Sohn, S. Kim, H.-J. Kim, Y.-K. Kim, T.-H. Kim, Z. Zhang, E.-S. Shin, J.-E. Lee, J. H. Moon, S. H. Kim, K. H. Kim, Y.-C. Mun, H. Kim, J. Park, J. Kim and D. Kim, "Genome-wide genotype-based risk model for survival in acute myeloid leukemia patients with normal karyotype," *British Journal of Hematology*, vol. 163, pp. 62-71, July 2013.
- [35] B. Bhatnagar and R. Garzon, "The Use of Molecular Genetics to Refine Prognosis in Acute Myeloid Leukemia," *Current Hematology Malignancies Reports*, March 2014.
- [36] J. R. Downing, R. K. Wilson, J. Zhang, E. R. Mardis, C.-H. Pui, L. Ding, T. J. Ley and W. E. Evans, "The Pediatric Cancer Genome Project," *Nature Genetics*, vol. 44, no. 6, pp. 619-622, May 2012.
- [37] C. H. Pui and M. V. Relling, "Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia," *British*

- Journal of Haematology*, vol. 109, no. 1, pp. 13-23, April 2000.
- [38] S. Meller and J. Treleaven, "Translocations at 11q23 in childhood ALL: age under 1 and poor prognosis," *The Lancet*, vol. 359, pp. 1873-4, June 2002.
- [39] C.-H. Pui, P. S. Gaynon, J. M. Boyett, J. M. Chessells, A. Baruchel, W. Kamps, L. B. Silverman, A. Biondi, D. O. Harms, E. Vilmer, M. Schrappe und B. Camitta, „Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region," *The Lancet*, Bd. 359, pp. 1909-15, June 2002.
- [40] C.-H. Pui, J. M. Chessells, B. Camitta, A. Baruchel, A. Biondi, J. M. Boyett, A. Carroll, O. B. Eden, W. E. Evans, H. Gardner, J. Harbott, D. O. Harms, C. J. Harrison, P. L. Harrison, N. Heerema, G. Janka-Schaub, W. Kamps, G. Masera, J. Pullen, S. C. Raimondi, S. Richards, H. Riehm, S. Sallan, H. Sather, J. Shuster, L. B. Silverman, M. G. Valsecchi, E. Vilmer, Y. Zhou, P. S. Gaynon und M. Schrappe, „Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukaemia with 11q23 rearrangements," *Leukemia*, Bd. 17, pp. 700-706, 2003.
- [41] T. Burmeister, R. Marschalek, B. Schneider, C. Meyer, N. Göckbuget, S. Schwartz, D. Hoelzer and E. Thiel, "Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations," *Leukemia*, vol. 20, pp. 451-457, 2006.
- [42] C. Meyer, E. Kowarz, J. Hofmann, A. Renneville, J. Zuna, J. Trka, R. B. Abdelali, E. Macintyre, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, E. Delabesse, M. P. de Oliveira, H. Cave, E. Clappier, J. van Dongen, B. V. Balgobind, M. M. van den Heuvel-Eibrink, H. B. Beverloo, R. Panzer-Grumeyer, A. Teigler-Schlegel, J. Harbott, E. Kjeldsen, S. Schnittger, U. Koehl, B. Gruhn, O. Heidenreich, L. C. Chan, S. F. Yip, M. Krzywinski, C. Eckert, A. Moricke, M. Schrappe, C. N. Alonso, B. W. Schafer, J. Krauter, D. A. Lee, U. zur Stadt, G. Te Kronnie, R. Sutton, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, L. Lo Nigro, G. Tsaur, L. Fechina, T. Szczepanski, S. Strehl, D. Ilencikova, M. Molkentin, T. Burmeister, T. Dingermann, T. Klingebiel und R. Marschalek, „New insights to the MLL recombine of acute leukemias," *Leukemia*, Bd. 23, pp. 1490-1499, 2009.
- [43] Y. Zhang, A. Chen, X.-M. Yan and G. Huang, "Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia," *International Journal of Hematology*, vol. 96, no. 4, pp. 428-37, October 2012.
- [44] C. Meyer, J. Hofmann, T. Burmeister, D. Gröger, T. S. Park, M. Emerenciano, M. Pombo de Oliveira, A. Renneville, P. Villarese, E. Macintyre, H. Cave, E. Clappier, K. Mass-Malo, J. Zuna, J. Trka, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, S. H. Oh, G. Tsaur, L. Fechina, V. H. J. van der Velden, J. J. M. van Dongen, E. Delabesse, R. Binato, M. L. M. Silva, A. Kustanovich, O. Aleinikova, M. H. Harris, T. Lund-Aho, V. Juvonen, O. Heidenreich, J. Vormoor, W. W. L. Choi, M. Jarosova, A. Kolenova, C. Bueno, P. Menendez, S. Wehner, C. Eckert, P. Talmant, S. Tondeur, E. Lippert, E. Launay, C. Henry, P. Ballerini, H. Lapillone, M. B. Callanan, J. M. Cayuela, C. Herbaux, G. Cazzaniga, P. M. Kakadiya, S. Bohlander, M. Ahlmann, J. R. Choi, P. Gameiro, D. S. Lee, J. Krauter, P. Cornillet-Lefebvre, G. Te Kronnie, B. W. Schäfer, S. Kubetzko, C. N. Alonso, U. zur Stadt, R. Sutton, N. C. Venn, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, H. O. Madsen, P. Archer, J. Hancock, N. Cerveira, M. R. Teixeira, L. Lo Nigro, A. Möricke, M. Stanulla, M. Schrappe, L. Sedék, T. Szczepanski, C. M. Zwaan, E. A. Coenen, M. M. van den Heuvel-Eibrink, S. Strehl, M. Dworzak, R. Panzer-Grümayer, T. Dingermann, T. Klingebiel and R. Marschalek, "The MLL recombine of acute leukemias in 2013," *Leukemia*, vol. 27, pp. 2165-2176, 2013.
- [45] R. Marschalek, "Translocations of the MLL gene: New insights into high-risk leukemia," *Pharmazie in unserer Zeit*, vol. 41, no. 3, pp. 196-200, May 2012.
- [46] N. Cerveira, S. Lisboa, C. Correia, S. Bizzaro, J. Santos, L. Torres, J. Vieira, J. D. Barros-Silva, D. Pereira, C. Moreira, C. Meyer, T. Oliva, I. Moreira, Â. Martins, C. Viterbo, V. Costa, R. Marschalek, A. Pinto, J. M. Mariz and M. R. Teixeira, "Genetic and clinical characterization of 45 acute leukemia patients with MLL gene rearrangements from a single institution," *Molecular Oncology*, vol. 6, no. 5, pp. 553-564, October 2012.
- [47] I. Nilson, K. Löchner, G. Siegler, J. Greil, J. D. Beck, G. H. Fey and R. Marschalek, "Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias," *British Journal of Haematology*, vol. 93, no. 4, pp. 966-972, June 1996.

- 
- [48] P. L. Broeker, H. G. Super, M. J. Thirman, H. Pomykala, Y. Yonebayashi, S. Tanabe, N. Zeleznik-Le and J. D. Rowley, "Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites.," *Blood*, vol. 87, no. 5, pp. 1912-22, March 1996.
- [49] P. D. Aplan, D. S. Chervinsky, M. Stanulla and W. C. Burhans, "Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors.," *Blood*, vol. 87, no. 7, pp. 2649-58, April 1996.
- [50] G. Cimino, M. C. Rapanotti, A. Biondi, L. Elia, F. La Coco, C. Price, V. Rossi, A. Rivolta, E. Canaani, C. M. Croce, F. Mandelli and M. Greaves, "Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias.," *Cancer Research*, vol. 57, no. 14, pp. 2879-83, July 1997.
- [51] P. L. Strissel, R. Strick, J. D. Rowley and N. Zeleznik-Le, "An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region.," *Blood*, vol. 92, no. 10, pp. 3793-803, November 1998.
- [52] P. L. Deininger and M. A. Batzer, "Alu repeats and human disease.," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 67, no. 3, pp. 183-93, July 1999.
- [53] M. Reichel, E. Gillert, S. Angermüller, J. P. Hensel, F. Heidel, M. Lode, T. Leis, A. Biondi, O. A. Haas, S. Strehl, E. R. Panzer-Grümayer, F. Griesinger, J. D. Beck, O. H. Fey, F. M. Uckun and R. Marschalek, "Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL.," *Oncogene*, vol. 20, no. 23, pp. 2900-7, March 2001.
- [54] S. Scharf, J. Zech, A. Bursen, D. Schraets, P. L. Oliver, S. Kliem, E. Pfitzner, E. Gillert, T. Dingermann and R. Marschalek, "Transcription linked to recombination: a gene-internal promoter coincides with the recombination hot spot II of the human MLL gene.," *Oncogene*, vol. 26, no. 10, pp. 1361-71, March 2007.
- [55] I. G. Cowell and C. A. Austin, "Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents.," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 9, no. 6, pp. 2075-91, June 2012.
- [56] M. Emerenciano, C. Meyer, M. B. Mansur, R. Marschalek and M. S. Pombo-de-Oliveira, "The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia.," *British Journal of Haematology*, vol. 161, no. 2, pp. 224-36, April 2013.
- [57] R. L. Wright and A. T. M. Vaughan, "A systematic description of MLL fusion gene formation.," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 91, no. 3, pp. 283-291, September 2014.
- [58] C. A. Felix, "Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1400, no. 1-3, 233-55 October 1998.
- [59] R. Strick, P. L. Strissel, S. Borgers, S. L. Smith and J. D. Rowley, "Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 97, no. 9, pp. 4790-5, April 2000.
- [60] K. Vanhees, L. de Bock, R. W. L. Godschalk, F. J. van Schooten and S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, "Prenatal Exposure to Flavonoids: Implication for Cancer Risk," *Toxicological Sciences*, vol. 120, no. 1, pp. 59-67, March 2011.
- [61] M. S. Pombo-de-Oliveira, S. Koifman and Brazilian Collaborative Study Group of IAL, "Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy.," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 15, no. 12, pp. 2336-41, December 2006.
- [62] S. Schnyder, N. T. Du, H. B. Le, S. Singh, G. A. Loreda and A. T. Vaughan, "Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells.," *Leukemia Research*, vol. 33, no. 10, pp. 1400-4, October 2009.
- [63] A. V. Moorman, "The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia," *Blood Reviews*, vol. 26, no. 3, pp. 123-135, May 2012.
-

- [64] C.-H. Pui, L. S. Frankel, A. J. Carroll, S. C. Raimondi, J. J. Shuster, D. R. Head, W. M. Crist, V. J. Land, D. J. Pullen and C. P. Steuber, "Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases," *Blood*, vol. 77, no. 3, pp. 440-7, February 1991.
- [65] H. Tamai and K. Inokuchi, "11q23/MLL Acute Leukemia: Update of Clinical Aspects," *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, vol. 50, no. 2, pp. 91-98, November 2010.
- [66] C.-H. Pui, "Acute Leukemias with t(4;11)(q21;q23)," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 7, no. 3, pp. 173-179, June 1992.
- [67] R. Marschalek, "Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins," *British Journal of Haematology*, vol. 152, no. 2, pp. 141-154, January 2011.
- [68] C.-H. Pui, M. Schrappe, R. C. Ribeiro and C. M. Niemeyer, "Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia," *Hematology ASH Education Program*, pp. 118-45, 2004.
- [69] D. I. Marks, A. V. Moorman, L. Chilton, E. Paieta, A. Enshaie, G. DeWald, C. J. Harrison, A. K. Fielding, L. Foroni, A. H. Goldstone, M. R. Litzow, S. M. Luger, A. K. Mc Millan, J. Racevshis, J. M. Rowe, M. S. Tallman, P. Wiernik and H. M. Lazarus, "The clinical characteristics, therapy and outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial," *Haematologica*, vol. 98, no. 6, pp. 945-52, June 2013.
- [70] K. Fasching, S. Panzer, O. A. Haas, R. Marschalek, H. Gadner and E. R. Panzer-Grümayer, "Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia.," *Blood*, vol. 95, no. 8, pp. 2722-4, April 2000.
- [71] „NCBI - Gene Database,“ [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4297>. [Zugriff am 8. Mai 2014].
- [72] S. Ziemer van der Poel, N. R. McCabe, H. J. Gill, R. 3. Espinosa, Y. Patel, A. Harden, P. Rubinelli, S. D. Smith, M. M. Le Beau, J. D. Rowley and M. O. Diaz, "Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias.," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 88, no. 23, pp. 10735-10739, December 1991.
- [73] G. Cimino, D. T. Moir, O. Canaani, K. Williams, W. M. Crist, S. Katzav, L. Cannizzaro, B. Lange, P. C. Nowell, C. M. Croce und E. Canaani, „Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations.," *Cancer Research*, Bd. 51, Nr. 24, pp. 6712-4, December 1991.
- [74] Y. Gu, T. Nakamura, H. Alder, R. Prasad, O. Canaani, G. Cimino, C. M. Croce and E. Canaani, "The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene.," *Cell*, vol. 71, no. 4, pp. 701-8, November 1992.
- [75] M. Djabali, L. Selleri, P. Parry, M. Bower, B. D. Young and G. A. Evans, "A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias.," *Nature Genetics*, vol. 2, no. 2, pp. 113-8, October 1992.
- [76] D. C. Tkachuk, S. Kohler and M. L. Cleary, "Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias.," *Cell*, vol. 71, no. 4, pp. 691-700, November 1992.
- [77] P. H. Domer, S. S. Fakhrazadeh, C. S. Chen, J. Jockel, L. Johansen, G. A. Silverman, J. H. Kersey and S. J. Korsmeyer, "Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product.," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 90, no. 16, pp. 7884-8, August 1993.
- [78] C. Meyer, E. Kowarz, B. Schneider, C. Oehm, T. Klingebiel, T. Dingermann and R. Marschalek, "Genomic DNA of leukemic patients: Target for clinical diagnosis of MLL rearrangements," *Biotechnology*, vol. 1, no. 6, pp. 656-663, June 2006.
- [79] T. Yano, T. Nakamura, J. Blechman, C. Sorio, C. V. Dang, B. Geiger and E. Canaani, "Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein,"

- Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, no. 14, pp. 7286-7291, July 1997.
- [80] M. Birke, S. Schreiner, M. P. García-Cuéllar, K. Mahr, F. Titgemeyer and R. K. Slany, "The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation," *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 4, pp. 958-965, February 2002.
- [81] N. J. Zeleznik-Le, A. M. Harden and J. D. Rowley, "11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 91, no. 22, pp. 10610-10614, October 1994.
- [82] Z. B. Xia, M. Anderson, M. O. Diaz and N. J. Zeleznik-Le, "MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein.," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 100, no. 14, pp. 8342-8347, July 2003.
- [83] Z. Wang, J. Song, T. A. Milne, G. G. Wang, H. Li, C. D. Allis and D. J. Patel, "Pro Isomerization in MLL1 PHD3-Bromo Cassette Connects H3K4me Readout to CYP33 and HDAC-Mediated Repression," *Cell*, vol. 141, no. 7, pp. 1183-1194, June 2010.
- [84] J. Wang, A. G. Muntean, L. Wu and J. L. Hess, "A subset of mixed lineage leukemia proteins has plant homeodomain (PHD)-mediated E3 ligase activity," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 52, pp. 43410-43416, December 2012.
- [85] A. Yokoyama, I. Kitabayashi, P. M. Ayton, M. L. Cleary and M. Ohki, "Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties," *Blood*, vol. 100, no. 10, pp. 3710-3718, November 2002.
- [86] J. J. Hsieh, P. Ernst, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer, "Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization," *Molecular and cellular biology*, vol. 23, no. 1, pp. 186-194, January 2003.
- [87] J. J. Hsieh, E. H. Cheng and S. J. Korsmeyer, "Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression," *Cell*, vol. 115, no. 3, pp. 293-303, October 2003.
- [88] B. Pless, C. Oehm, S. Knauer, R. H. Stauber, T. Dingermann and R. Marschalek, "The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC--are potential target structures in t(4;11) leukemia," *Leukemia*, vol. 25, no. 4, pp. 663-670, April 2011.
- [89] A. Yokoyama, F. Ficara, M. J. Murphy, C. Meisel, A. Naresh, Kitabayashi I. and M. L. Cleary, "Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways.," *Journal of cell science*, vol. 124, no. 13, pp. 2208-2219, July 2011.
- [90] A. Yokoyama, F. Ficara, M. J. Murphy, C. Meisel, C. Hatanaka, I. Kitabayashi and M. L. Cleary, "MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing," *PLoS one*, vol. 8, no. 9, p. e73649, September 2013.
- [91] P. Ernst, J. Wang, M. Huang, R. H. Goodman and S. J. Korsmeyer, "MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein," *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 7, pp. 2249-2258, April 2001.
- [92] T. A. Milne, S. D. Briggs, H. W. Brock, M. E. Martin, D. Gibbs, C. D. Allis and J. L. Hess, "MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters," *Molecular cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1107-1117, November 2002.
- [93] T. Nakamura, T. Mori, S. Tada, W. Krajweski, T. Rozovskaia, R. Wassell, G. Dubois, A. Mazo, C. M. Croce and E. Cavanaugh, "ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation," *Molecular cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1119-1128, November 2002.
- [94] D. Mbangkollo, R. Burnett, N. McCabe, M. Thirman, H. Gill, H. Yu, J. D. Rowley and M. O. Diaz, "The human MLL gene: nucleotide sequence, homology to the Drosophila trx zinc-finger domain, and alternative splicing.," *DNA and cell biology*, vol. 14, no. 6, pp. 475-483, June 1995.

- 
- [95] L. H. Butler, R. Slany, X. Cui, M. L. Cleary and D. Y. Mason, "The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures," *Blood*, vol. 89, no. 9, pp. 3361-3370, May 1997.
- [96] P. A. Steffen and L. Ringrose, "What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory," *Nature reviews. Molecular cell biology.*, vol. 15, no. 5, pp. 340-356, May 2014.
- [97] B. Agiropoulos and R. K. Humphries, "Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis," *Oncogene*, vol. 26, no. 47, pp. 6766-6776, October 2007.
- [98] B. D. Yu, J. L. Hess, S. E. Horning, G. A. Brown and S. J. Korsmeyer, "Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice," *Nature*, vol. 378, no. 6556, pp. 505-508, November 1995.
- [99] B. D. Yu, R. D. Hanson, J. L. Hess, S. E. Horning and S. J. Korsmeyer, "MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 95, no. 18, pp. 10632-10636, September 1998.
- [100] J. L. Hess, B. D. Yu, B. Li, R. Hanson and S. J. Korsmeyer, "Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos," *Blood*, vol. 90, no. 5, pp. 1799-1806, November 1997.
- [101] H. Yagi, K. Deguchi, A. Aono, Y. Tani, T. Kishimoto and T. Komori, "Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice," *Blood*, vol. 92, no. 1, pp. 108-117, July 1998.
- [102] P. Ernst, M. Mabon, A. J. Davidson, L. I. Zon and S. J. Korsmeyer, "An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion," *Current biology*, Vols. 14-22, pp. 2063-2069, November 2004.
- [103] A. Yokoyama, Z. Wang, J. Wysocka, M. Sanyal, D. J. Aufiero, I. Kitabayashi, W. Herr and M. L. Cleary, "Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression," *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 13, pp. 5639-5649, July 2004.
- [104] Y. Dou, T. A. Milne, A. J. Ruthenburg, S. Lee, J. W. Lee, G. L. Verdine, C. D. Allis and R. G. Roeder, "Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components," *Nature structural & molecular biology*, vol. 13, no. 8, pp. 713-719, August 2006.
- [105] A. G. Muntean, „Mechanisms of mixed-lineage leukemia,“ *INternational Journal of Hematology and Oncology*, Bd. 2, Nr. 3, pp. 207-217, June 2013.
- [106] S. L. Berger, "The complex language of chromatin regulation during transcription," *Nature*, vol. 447, no. 7143, pp. 407-412, May 2007.
- [107] Y. Dou, T. A. Milne, A. J. Tackett, E. R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka, C. D. Allis, B. D. Chait, J. L. Hess and R. G. Roeder, "Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF," *Cell*, vol. 121, no. 6, pp. 873-885, June 2005.
- [108] J. Wysocka, M. P. Myers, C. D. Laherty, R. N. Eisenman and W. Herr, "Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1," *Genes and development*, vol. 17, no. 7, pp. 896-911, April 2003.
- [109] T. A. Milne, C. M. Hughes, R. Lloyd, Z. Yang, O. Rozenblatt-Rosen, Y. Dou, R. W. Schnepf, C. Krankel, V. A. Livolsi, D. Gibbs, X. Hua, R. G. Roeder, M. Meyerson and J. L. Hess, "Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 102, no. 3, pp. 749-754, January 2005.
- [110] A. Yokoyama, T. C. Sommerville, K. S. Smith, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson and M. L. Cleary, "The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis," *Cell*, vol. 123, no. 2, pp. 207-218, October 2005.
- [111] A. Laugesen and K. Helin, "Chromatin Repressive Complexes in Stem Cells, Development, and Cancer," *Cell stem cell*, vol. 14, no. 6, pp. 735-751, June 2014.
-

- 
- [112] L. Di Croce and K. Helin, "Transcriptional regulation by Polycomb group proteins," *Nature structural & molecular biology*, vol. 20, no. 10, pp. 1147-1155, October 2013.
- [113] H. Weishaupt, M. Sigvardsson and J. L. Attema, "Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells," *Blood*, vol. 115, no. 2, pp. 247-256, January 2010.
- [114] U. Schindler, H. Beckmann and A. R. Cashmore, "HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region.," *The Plant Journal*, vol. 4, no. 1, pp. 137-150, July 1993.
- [115] R. Aasland, T. J. Gibson and A. F. Stewart, "The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation.," *Trends in biochemical sciences*, vol. 20, no. 2, pp. 56-59, February 1995.
- [116] M. Bienz, "The PHD-finger, a nuclear protein-interaction domain," *Trends in Biochemical sciences*, vol. 31, no. 1, pp. 35-40, January 2006.
- [117] L. A. Baker, C. D. Allis and G. G. Wang, "PHD fingers in human diseases: disorders arising from misinterpreting epigenetic marks," *Mutation Research*, vol. 647, no. 1-2, pp. 3-12, December 2008.
- [118] J. M. Matthews, M. Bhati, E. Lehtomaki, R. E. Mansfield, L. Cubeddu and J. P. Mackay, "It takes two to tango: the structure and function of LIM, RING, PHD and MYND domains," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 31, pp. 3681-3696, November 2009.
- [119] R. Sanchez and M.-M. Zhou, "The PHD finger: a versatile epigenome reader," *Trends in Biochemical sciences*, vol. 36, no. 7, pp. 364-372, July 2011.
- [120] K. Fair, M. Anderson, E. Bulanova, H. Mi, M. Tropschug and M. O. Diaz, "Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells," *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 10, pp. 3589-3597, May 2001.
- [121] T. Rössler and R. Marschalek, "An alternative splice process renders the MLL protein either into a transcriptional activator or repressor," *Die Pharmazie*, vol. 68, no. 7, pp. 601-607, July 2013.
- [122] M. Ali, R. A. Hom, W. Blakeslee, L. Ikenouye and T. G. Kutateladze, "Diverse functions of PHD fingers of the MLL/KMT2A subfamily," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1843, no. 2, pp. 366-371, February 2014.
- [123] A. G. Muntean, D. Giannola, A. M. Udager and J. L. Hess, "The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation," *Blood*, vol. 112, no. 12, pp. 4690-4693, December 2008.
- [124] B. Linder, R. Newman, L. K. Jones, S. Debernardi, B. D. Young, P. Freemont, C. P. Verrijzer and V. Saha, "Biochemical analyses of the AF10 protein: the extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation," *Journal of Molecular Biology*, vol. 299, no. 2, pp. 369-378, June 2000.
- [125] P. Y. Chang, R. A. Hom, C. A. Musselman, L. Zhu, A. Kuo, O. Gozani, T. G. Kutateladze and M. L. Cleary, "Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription," *Journal of molecular biology*, vol. 400, no. 2, pp. 137-144, July 2010.
- [126] S. Park, U. Osmer, G. Raman, R. H. Schwantes, M. O. Diaz and J. H. Bushweller, "The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression," *Biochemistry*, vol. 49, no. 31, pp. 6576-6586, August 2010.
- [127] M. Anderson, K. Fair, S. Amero, S. Nelson, P. J. Harte and M. O. Diaz, "A new family of cyclophilins with an RNA recognition motif that interact with members of the trx/MLL protein family in Drosophila and human cells.," *Development genes and evolution*, no. 212, pp. 107-113, April 2002.
- [128] R. A. Hom, P.-Y. Chang, S. Roy, C. A. Musselman, K. C. Glass, A. I. Selezneva, O. Gozani, R. F. Ismagilov, M. L. Cleary and T. G. Kutateladze, "Molecular mechanism of MLL PHD3 and RNA recognition by the Cyp33 RRM domain," *Journal of molecular biology*, vol. 400, no. 2, pp. 145-154, July 2010.
- [129] D. Hodges and S. I. Bernstein, "Genetic and biochemical analysis of alternative RNA splicing,"
-

- Advances in genetics*, vol. 31, pp. 207-281, 1994.
- [130] D. K. Nam, K. Honoki, M. Yu and J. J. Yunis, "Alternative RNA splicing of the MLL gene in normal and malignant cells," *Gene*, vol. 178, no. 1-2, pp. 169-175, October 1996.
- [131] V. Divoky, J. M. Trka, F. Watzinger and T. Lion, "Cryptic splice site activation during RNA processing of MLL/AF4 chimeric transcripts in infants with t(4;11) positive ALL," *Gene*, vol. 247, no. 1-2, pp. 111-118, April 2000.
- [132] C. Caldas, C. W. So, A. Mac Gregor, A. M. Ford, B. Mc Donald, L. C. Chan and L. M. Wiedemann, "Exon scrambling of MLL transcripts occur commonly and mimic partial genomic duplication of the gene," *Gene*, vol. 208, no. 2, pp. 167-176, February 1998.
- [133] Q. Ma, H. Alder, K. K. Nelson, D. Chatterje, Y. Gu, T. Nakamura, E. Canaani, C. M. Croce, L. D. Siracusa and A. M. Buchberg, "Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with the human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 90, no. 13, pp. 6350-6354, July 1993.
- [134] E. Kowarz, J. Merkens, M. Karas, T. Dingermann and R. Marschalek, "Premature transcript termination, trans-splicing and DNA repair: a vicious path to cancer," *American journal of blood research*, vol. 1, no. 1, pp. 1-12, April 2011.
- [135] J. Morrissey, D. C. Tkachuk, A. Milatovich, U. Francke, M. Link and M. L. Cleary, "A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias," *Blood*, vol. 81, no. 5, pp. 1124-1131, March 1993.
- [136] T. Nakamura, H. Alder, Y. Gu, R. Prasad, O. Canaani, N. Kamada, R. P. Gale, B. Lange, W. M. Crist, P. C. Nowell, C. M. Croce and E. Canaani, "Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 90, no. 10, pp. 4631-4635, May 1993.
- [137] C. S. Chen, J. M. Hilden, J. Frestedt, P. H. Domer, R. Moore, S. J. Korsmeyer and J. H. Kersey, "The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia," *Blood*, vol. 82, no. 4, pp. 1080-1085, August 1993.
- [138] I. Nilson, M. Reichel, M. G. Ennas, R. Greim, C. Knörr, G. Siegler, J. Greil, G. H. Fey and R. Marschalek, "Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia," *British Journal of Haematology*, vol. 98, no. 1, pp. 157-169, July 1997.
- [139] J. M. Hilden, C. S. Chen, R. Moore, J. Frestedt and J. H. Kersey, "Heterogeneity in MLL/AF-4 fusion messenger RNA detected by the polymerase chain reaction in t(4;11) acute leukemia," *Cancer Research*, vol. 53, no. 17, pp. 3853-3856, September 1993.
- [140] J. Corral, A. Forster, S. Thompson, F. Lampert, Y. Kaneko, R. Slater, W. G. Kroes, C. E. van der Schoot, W. D. Ludwig, A. Karpas, C. Pockock and F. Cotter, "Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 90, no. 18, pp. 8538-8542, September 1993.
- [141] J. W. Janssen, W. D. Ludwig, A. Borkhardt, U. Spadinger, H. Rieder, C. Fonatsch, D. K. Hossfeld, J. Harbott, A. S. Schulz and R. Repp, "Pre-pre-B acute lymphoblastic leukemia: high frequency of alternatively spliced ALL1-AF4 transcripts and absence of minimal residual disease during complete remission," *Blood*, vol. 84, no. 11, pp. 3835-3842, December 1994.
- [142] J. L. Frestedt, J. M. Hilden, R. O. Moore and J. H. Kersey, "Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues," *Genetic analyses: biomolecular engineering*, vol. 12, no. 3-4, pp. 147-149, 1996 January.
- [143] Q. Li, J. L. Frestedt and J. H. Kersey, "AF4 encodes a ubiquitous protein that in both native and MLL-AF4 fusion types localizes to subnuclear compartments," *Blood*, vol. 92, no. 10, pp. 3841-3847, November 1998.
- [144] C. Ma and L. M. Staudt, "LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential

- that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias," *Blood*, vol. 87, no. 2, pp. 734-745, January 1996.
- [145] J. Gecz, A. K. Gedeon, G. R. Sutherland and J. C. Mulley, "Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation," *Nature Genetics*, vol. 13, no. 1, pp. 105-108, May 1996.
- [146] Y. Gu, Y. Shen, R. A. Gibbs and D. L. Nelson, "Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island," *Nature Genetics*, vol. 13, no. 1, pp. 109-113, May 1996.
- [147] J. L. Frestedt, J. M. Hilden and J. H. Kersey, "AF4/FEL, a gene involved in infant leukemia: sequence variations, gene structure, and possible homology with a genomic sequence on 5q31," *DNA and cell biology*, vol. 15, no. 8, pp. 669-678, August 1996.
- [148] T. Taki, H. Kano, M. Taniwaki, M. Sako, M. Yanagisawa and Y. Hayashi, "AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23)," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 96, no. 25, pp. 14535-14540, December 1999.
- [149] A. R. van Bergh, H. B. Beverloo, P. Rombout, E. R. van Wering, M. H. van Weel, G. C. Beverstock, P. M. Kluin, R. M. Slater and E. Schuurin, "LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia," *Genes, chromosomes and cancer*, vol. 35, no. 1, pp. 92-96, September 2002.
- [150] M. Hiwatari, T. Taki, T. Taketani, M. Taniwaki, K. Sugita, M. Okuya, M. Eguchi, K. Ida and Y. Hayashi, "Fusion of an AF4-related gene, LAF4, to MLL in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(2;11)(q11;q23)," *Oncogene*, vol. 22, no. 18, pp. 2851-2855, May 2003.
- [151] L. Chakrabarti, S. J. Knight, A. V. Flannery and K. E. Davies, "A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site," *Human molecular genetics*, vol. 5, no. 2, pp. 275-282, February 1996.
- [152] F. Wittwer, A. van der Straten, K. Keleman, B. J. Dickson and E. Hafen, "Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth," *Development*, vol. 128, no. 5, pp. 791-800, March 2001.
- [153] A. H. Tang, T. P. Neufeld, G. M. Rubin and H. A. Müller, "Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, lilliputian," *Development*, vol. 128, no. 5, pp. 801-813, March 2001.
- [154] R. Prasad, T. Yano, C. Sorio, T. Nakamura, R. Rallapalli, Y. Gu, D. Leshkowitz, C. M. Croce and E. Canaani, "Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 92, no. 26, pp. 12160-12164, December 1995.
- [155] J. J. Morrissey, S. Raney and M. L. Cleary, "The FEL (AF-4) protein donates transcriptional activation sequences to Hrx-Fel fusion proteins in leukemias containing T(4;11)(Q21;Q23) chromosomal translocations," *Leukemia Research*, vol. 21, no. 10, pp. 911-917, October 1997.
- [156] M. A. Hillman and J. Gecz, "Fragile XE-associated familial mental retardation protein 2 (FMR2) acts as a potent transcription activator," *Journal of human genetics*, vol. 46, no. 5, pp. 251-259, 2001.
- [157] M. Melko, D. Douguet, M. Bensaid, S. Zongaro, C. Verheggen, J. Gecz and B. Bardoni, "Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNA-binding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability," *Human molecular genetics*, vol. 20, no. 10, pp. 1873-1885, May 2011.
- [158] K. Baskaran, F. Erfurth, G. Taborn, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, P. M. Iannaccone and P. H. Domer, "Cloning and developmental expression of the murine homolog of the acute leukemia proto-oncogene AF4," *Oncogene*, vol. 15, no. 16, pp. 1967-1978, October 1997.
- [159] P. Isnard, N. Coré, P. Naguet and M. Djabali, "Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene," *Blood*, vol. 96, no. 2, pp. 705-710, July 2000.

- 
- [160] A. M. Isaacs, P. L. Oliver, E. L. Jones, A. Jeans, A. Potter, B. H. Hovik, P. M. Nolan, L. Vizor, P. Glenister, A. K. Simon, I. C. Gray, N. K. Spurr, S. D. Brown, A. Hunter and K. E. Davies, "A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse," *The Journal of Neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 5, pp. 1631-1637, March 2003.
- [161] A. Bursen, S. Moritz, A. Gaussmann, S. Moritz, T. Dingermann and R. Marschalek, "Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology?," *Oncogene*, vol. 23, no. 37, pp. 6237-6249, August 2004.
- [162] P. L. Oliver, E. Bitoun, J. Clark, E. L. Jones and K. E. Davies, "Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 101, no. 41, pp. 14901-14906, October 2004.
- [163] F. Erfurth, C. S. Hemenway, A. C. de Erkenez and P. H. Domer, "MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci," *Leukemia*, vol. 18, no. 1, pp. 92-102, January 2004.
- [164] D. T. Zeisig, C. B. Bittner, B. B. Zeisig, M. P. García-Cuellar, J. L. Hess and R. K. Slany, "The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin," *Oncogene*, vol. 24, no. 35, pp. 5525-5532, August 2005.
- [165] E. Bitoun, P. L. Oliver and K. E. Davies, "The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling," *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 1, pp. 92-106, January 2007.
- [166] A. Yokoyama, M. Lin, A. Naresh, I. Kitabayashi and M. L. Cleary, "A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription," *Cancer cell*, vol. 17, no. 2, pp. 198-212, February 2010.
- [167] A. Benedikt, S. Baltruschat, B. Scholz, A. Bursen, T. N. Arrey, B. Meyer, L. Varagnolo, A. M. Müller, M. Karas, T. Dingermann and R. Marschalek, "The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures," *Leukemia*, vol. 25, no. 1, pp. 135-144, January 2011.
- [168] G. Esposito, A. Cevenini, A. Cuomo, F. de Falco, D. Sabbatino, F. Pane, M. Ruoppolo and F. Salvatore, "Protein network study of human AF4 reveals its central role in RNA Pol II-mediated transcription and in phosphorylation-dependent regulatory mechanisms," *The Biochemical Journal*, vol. 438, no. 1, pp. 121-131, August 2011.
- [169] H. Lu, Z. Li, Y. Xue, U. Schulze-Gahmen, J. R. Johnson, N. J. Krogan, T. Alber and Q. Zhou, "AFF1 is a ubiquitous P-TEFb partner to enable Tat extraction of P-TEFb from 7SK snRNP and formation of SECs for HIV transactivation," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 111, no. 1, pp. E15-24, January 2014.
- [170] A. B. Mak, A. M. Nixon and J. Moffat, "The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription," *Cancer research*, vol. 72, no. 8, pp. 1929-1934, April 2012.
- [171] E. Kowarz, t. Burmeister, L. Lo Nigro, M. W. Jansen, E. Delabesse, T. Klingebiel, T. Dingermann, C. Meyer and R. Marschalek, "Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele," *Leukemia*, vol. 21, no. 6, pp. 1232-1238, June 2007.
- [172] A. Borkhardt, R. Repp, E. Haupt, S. Brettreich, U. Buchen, R. Gossen and F. Lampert, "Molecular analysis of MLL-1/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia," *Leukemia*, vol. 8, no. 4, pp. 549-553, April 1994.
- [173] J. D. Rowley, "The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and 11;19 translocations in acute leukemia," *Genes, chromosomes and cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 264-266, October 1992.
- [174] F. E. Bertrand, C. Vogtenhuber, N. Shah and T. W. Le Bien, "Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/AF4 fusion protein," *Blood*, vol. 98, no. 12, pp. 3398-3405, December 2001.
- [175] E. C. Collins and T. H. Rabbits, "The promiscuous MLL gene links chromosomal translocations to cellular differentiation and tumour tropism," *Trends in molecular medicine*, vol. 8, no. 9, pp.
-

---

436-442, September 2002.

- [176] F. Pane, M. Intrieri, B. Izzo, C. Quintarelli, D. Vitale, R. Migliorati, L. Sebastio and F. Salvatore, "A novel MLL/AF4 fusion gene lacking the AF4 transactivating domain in infant acute lymphoblastic leukemia," *Blood*, vol. 100, no. 12, pp. 4247-4248, December 2002.
- [177] F. E. Bertrand, J. D. Spengeman, N. Shah and T. W. Le Bien, "B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression," *Leukemia*, vol. 17, no. 12, pp. 2454-2459, December 2003.
- [178] M. G. Guenther, L. N. Lawton, T. Rozovskaia, G. M. Frampton, S. S. Levine, T. L. Volkert, C. M. Croce, T. Nakamura, E. Canaani and R. A. Young, "Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia," *Genes & development*, vol. 22, no. 24, pp. 3404-3408, December 2008.
- [179] C. Bueno, R. Montes, G. J. Melen, V. Ramos-Mejia, P. J. Real, V. Ayllón, L. Sanchez, G. Ligeró, I. Gutierrez-Aranda, A. F. Fernández, M. F. Fraga, I. Moreno-Gimeno, D. Burks, M. del Carmen Plaza-Calonge, J. C. Rodríguez-Manzaneeque and P. Menendez, "A human ESC model for MLL-AF4 leukemic fusion gene reveals an impaired early hematopoietic-endothelial specification," *Cell research*, vol. 22, no. 6, pp. 986-1002, June 2012.
- [180] M. C. Chillón, M. T. Gómez-Casares, C. E. López-Jorge, C. Rodriguez-Medina, A. Molines, M. E. Sarasquete, M. Alcoceba, J. D. Miguel, C. Bueno, R. Montes, F. Ramos, J. N. Rodríguez, P. Giraldo, M. Ramírez, R. García-Delgado, J. L. Fuster, M. González-Díaz and P. Menendez, "Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia," *Leukemia*, vol. 26, no. 11, pp. 2360-2366, November 2012.
- [181] A. C. Wilkinson, E. Ballabio, H. Geng, P. North, M. Tapia, J. Kerry, D. Biswas, R. G. Roeder, C. D. Allis, A. Melnick, M. F. de Bruijn and T. A. Milne, "RUNX1 is a key target in t(4;11) leukemias that contributes to gene activation through an AF4-MLL complex interaction," *Cell reports*, vol. 3, no. 1, pp. 116-127, January 2013.
- [182] C. Bueno, V. Ayllón, R. Montes, O. Navarro-Montero, V. Ramos-Mejia, P. J. Real, D. Romero-Moya, M. J. Araúzo-Bravo and P. Menendez, "FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs," *Blood*, vol. 121, no. 19, pp. 3867-3878, May 2013.
- [183] R. Montes, V. Ayllón, C. Prieto, A. Bursen, C. Prella, D. Romero-Moya, P. J. Real, O. Navarro-Montero, C. Chillón, R. Marschalek, C. Bueno and P. Menendez, "Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells," *Leukemia*, vol. 28, no. 3, pp. 666-674, March 2014.
- [184] L. Trentin, M. Giordan, T. Dingermann, G. Basso, G. Te Kronnie and R. Marschalek, "Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients," *European journal of hematology*, vol. 83, no. 5, pp. 406-419, November 2009.
- [185] R. W. Stam, P. Schneider, J. A. Hagelstein, M. H. van der Linden, D. J. Stumpel, R. X. de Menezes, P. de Lorenzo, M. G. Valsecchi and R. Pieters, "Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants," *Blood*, vol. 115, no. 14, pp. 2835-2844, April 2010.
- [186] E. De Braekeleer, N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, A. Basinko, F. Morel and M. De Braekeleer, "Gene expression profiling of adult t(4;11)(q21;q23)-associated acute lymphoblastic leukemia reveals a different signature from pediatric cases," *Anticancer research*, vol. 32, no. 9, pp. 3893-3899, September 2012.
- [187] C. L. Dobson, A. J. Warren, R. Pannell, A. Forster and T. H. Rabbitts, "Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene," *The EMBO journal*, vol. 19, no. 5, pp. 843-851, March 2000.
- [188] W. Chen, Q. Li, W. A. Hudson, A. Kumar, N. Kirchhof and J. H. Kersey, "A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy," *Blood*, vol. 108, no. 2, pp. 669-677, July 2006.
- [189] M. Metzler, A. Forster, R. Pannell, M. J. Arends, A. Daser, M. N. Lobato and T. H. Rabbitts, "A

- conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using invertebrate technology," *Oncogene*, vol. 25, no. 22, pp. 3093-3103, May 2006.
- [190] J. H. Kersey, D. Wang and M. Oberto, "Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis," *Leukemia*, vol. 12, no. 10, pp. 1561-1564, October 1998.
- [191] S. A. Armstrong, J. E. Staunton, L. B. Silverman, R. Pieters, M. L. den Boer, M. D. Minden, S. E. Sallan, E. S. Lander, T. R. Golub and S. J. Korsmeyer, "MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia," *Nature genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 41-47, January 2002.
- [192] A. A. Ferrando, S. A. Armstrong, D. S. Neuberg, S. E. Sallan, L. B. Silverman, S. J. Korsmeyer and A. T. Look, "Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation," *Blood*, vol. 102, no. 1, pp. 262-268, July 2003.
- [193] C. Caslini, A. Serna, V. Rossi, M. Introna and A. Biondi, "Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein," *Leukemia*, vol. 18, no. 6, pp. 1064-1071, June 2004.
- [194] K. Orlovsky, A. Kalinkovich, T. Rozovskaia, E. Shezen, T. Itkin, H. Alder, H. G. Ozer, L. Carramusa, A. Avigdor, S. Volinia, A. Buchberg, A. Mazo, O. Kollet, C. Largman, C. M. Croce, T. Nakamura, T. Lapidot and E. Canaani, "Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 19, pp. 7956-7961, May 2011.
- [195] H. Tamai, K. Miyake, H. Yamaguchi, M. Takatori, K. Dan, K. Inokuchi and T. Shimada, "AAV8 vector expressing IL24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice," *Blood*, vol. 119, no. 1, pp. 64-71, January 2012.
- [196] Z. B. Xia, R. Popovic, J. Chen, C. Theisler, T. Stuart, D. A. Santillan, F. Erfurth, M. O. Diaz and N. J. Zeleznik-Le, "The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 102, no. 39, pp. 14028-14033, September 2005.
- [197] M. Thomas, A. Gessner, H. P. Vornlocher, P. Hadwiger, J. Greil and O. Heidenreich, "Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells," *Blood*, vol. 106, no. 10, pp. 3559-3566, November 2005.
- [198] A. Gessner, M. Thomas, P. G. Castro, L. Büchler, A. Scholz, T. H. Brümmendorf, N. M. Soria, J. Vormoor, J. Greil and O. Heidenreich, "Leukemic fusion genes MLL/AF4 and AML1/MTG8 support leukemic self-renewal by controlling expression of the telomerase subunit TERT," *Leukemia*, vol. 24, no. 10, pp. 1751-1759, October 2010.
- [199] R. Montes, V. Ayllón, I. Gutierrez-Aranda, I. Prat, M. C. Hernández-Lamas, L. Ponce, S. Bresolin, G. Te Kronnie, M. Greaves, C. Bueon and P. Menendez, "Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia," *Blood*, vol. 117, no. 18, pp. 4746-4758, May 2011.
- [200] H. Nakanishi, T. Nakamura, E. Canaani and C. M. Croce, "ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 36, pp. 14442-14447, September 2007.
- [201] R. Ono, H. Kumagai, H. Nakajima, A. Hishiya, T. Taki, K. Horikawa, K. Takatsu, T. Satoh, Y. Hayashi, T. Kitamura and T. Nosaka, "Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation," *Leukemia*, vol. 23, no. 12, pp. 2197-2209, December.
- [202] M. H. Ng, R. K. Ng, C. T. Kong, D. Y. Jin and L. C. Chan, "Activation of Ras-dependent Elk-1 activity by MLL-AF4 family fusion oncoproteins," *Experimental hematology*, vol. 38, no. 6, June 2010.
- [203] H. Tamai, K. Miyake, M. Takatori, N. Miyake, H. Yamaguchi, K. Dan, T. Shimada and K. Inokuchi, "Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model," *Leukemia*, vol. 25, no. 5, pp. 888-891, May 2011.

- [204] L. Dou, D. Zheng, J. Li, Y. Li, L. Gao, L. Wang and L. Yu, "Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression," *Oncogene*, vol. 31, no. 4, pp. 507-517, January 2012.
- [205] L. Dou, J. Li, D. Zheng, Y. Li, X. Gao, C. Xu, L. Gao, L. Wang and L. Yu, "MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation in human acute lymphoblastic leukemia by targeting the MLL-AF4 oncogene," *Molecular biology reports*, no. 40, pp. 6811-6819, December 2013.
- [206] A. Gaussmann, T. Wenger, I. Eberle, A. Bursen, S. Bracharz, I. Herr, T. Dingermann and R. Marschalek, "Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation," *Oncogene*, vol. 26, no. 23, pp. 3352-3363, May 2007.
- [207] R. Marschalek, "It takes two-to-leukemia: about addictions and requirements," *Leukemia research*, vol. 35, no. 3, pp. 424-425, March 2011.
- [208] J. P. Roperch, F. Lethrone, S. Prieur, L. Piouffre, D. Israeli, M. Tuynder, M. Nemani, P. Pasturaud, M. C. Gendron, J. Dausset, M. Oren, R. B. Amson and A. Telerman, "SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1)," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 96, no. 14, pp. 8070-8073, July 1999.
- [209] H. Bruzzoni-Giovanelli, A. Faille, G. Linares-Cruz, M. Nemani, F. Le Deist, A. Germani, D. Chassoux, G. Millot, J. P. Roperch, R. Amson, A. Telerman and F. Calvo, "SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process," *Oncogene*, vol. 18, no. 50, pp. 7101-7109, November 1999.
- [210] A. Bursen, K. Schwabe, B. Ruster, R. Henschler, M. Ruthardt, T. Dingermann and R. Marschalek, "The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4," *Blood*, vol. 115, no. 17, pp. 3570-3579, April 2010.
- [211] G. Huang, X. Zhao, L. Wang, S. Elf, H. Xu, X. Zhao, G. Sashida, Y. Zhang, Y. Liu, J. Lee, S. Menendez, Y. Yang, X. Yan, P. Zhang, D. G. Tenen, M. Osato, J. J. Hsieh and S. D. Nimer, "The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations," *Blood*, vol. 118, no. 25, pp. 6544-6552, December 2011.
- [212] D. S. Sanders, A. G. Muntean and J. L. Hess, "Significance of AF4-MLL reciprocal fusion in t(4;11) leukemias," *Leukemia Research*, vol. 35, no. 3, pp. 299-300, March 2011.
- [213] A. R. Kumar, Q. Yao, Q. Li, T. A. Sam and J. H. Kersey, "t(4;11) leukemias display addiction to MLL-AF4 but not to AF4-MLL," *Leukemia research*, vol. 35, no. 3, pp. 305-309, March 2011.
- [214] M. C. Estable, M. H. Naghavi, H. Kato, H. Xiao, J. Qin, A. Vahlne and R. G. Roeder, "MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein," *Journal of biomedical Science*, vol. 9, no. 3, pp. 234-245, May-June 2002.
- [215] T. H. Tahirov, N. D. Babayeva, K. Varzavand, J. J. Cooper, S. C. Sedore and D. H. Price, "Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb," *Nature*, vol. 465, no. 7299, pp. 747-751, June 2010.
- [216] K. Asamitsu, Y. Hibi, K. Imai, A. F. Victoriano, E. Kurimoto, K. Kato and T. Okamoto, "Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation.," *Journal of molecular biology*, vol. 410, no. 5, pp. 887-895, 2011.
- [217] A. Schulte, N. Czudnochowski, M. Barboric, A. Schönichen, D. Blazek, B. M. Peterlin and M. Greyer, "Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24968-24977, July 2005.
- [218] M. Hoque, R. A. Shamanna, D. Guan, T. Pe'ery and M. B. Mathews, "HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1," *Journal of molecular biology*, vol. 410, no. 5, pp. 917-932, July 2011.

- [219] Y. Zhu, T. Pe'ery, J. Peng, Y. Ramanathan, N. Marshall, T. Marshall, B. Amendt, M. B. Mathews and D. H. Pryce, "Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro," *Genes & development*, vol. 11, no. 20, pp. 2622-2632, October 1997.
- [220] H. S. Mancebo, G. Lee, J. Flygare, J. Tomassini, P. Luu, Y. Zhu, J. Peng, C. Blau, D. Hazuda, D. Price and O. Flores, "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro," *Genes & development*, vol. 11, no. 20, pp. 2633-2644, October 1997.
- [221] M. Zhou, M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price and J. N. Brady, "Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription," *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 14, pp. 5077-5086, July 2000.
- [222] Y. H. Ping and T. M. Rana, "DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 16, pp. 12951-12958, April 2001.
- [223] K. Fujinaga, D. Irwin, Y. Huang, R. Taube, T. Kurosu and B. M. Peterlin, "Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element," *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 2, pp. 787-795, January 2004.
- [224] M. Zhou, L. Deng, V. Lacoste, H. U. Park, A. Pumfery, F. Kashanchi, J. N. Brady and A. Kumar, "Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription," *Journal of virology*, vol. 78, no. 24, pp. 13522-13533, December 2004.
- [225] N. He, M. Liu, J. Hsu, Y. Xue, S. Chou, A. Burlingame, N. J. Krogan, T. Alber und Q. Zhou, "HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription," *Molecular cell*, Bd. 38, Nr. 3, pp. 428-438, May 2010.
- [226] B. Sobhian, N. Laguette, A. Yatim, M. Nakamura, Y. Levy, R. Kiernan and M. Benkirane, "HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP," *Molecular cell*, vol. 38, no. 3, pp. 439-451, May 2010.
- [227] J. Gu, N. D. Babayeva, Y. Suwa, A. G. Baranovskiy, D. H. Price and T. H. Tahirov, "Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb and AFF4," *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 13, no. 11, pp. 1788-1797, January 2014.
- [228] H. C. Schmeisser, "SPONTANEOUS AND EXPERIMENTAL LEUKEMIA OF THE FOWL," *The Journal of experimental medecine*, vol. 22, no. 6, pp. 820-838, December 1915.
- [229] "VIRUSES AND CANCER," *British medical journal*, vol. 2, no. 3369, pp. 174-176, July 1925.
- [230] H. zur Hausen, "The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture)," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 48, no. 32, pp. 5798-5808, 2009.
- [231] J. Sinclair and P. Sissons, "Latency and reactivation of human cytomegalovirus," *The Journal of general virology*, vol. 87, no. Pt7, pp. 1763-1779, July 2006.
- [232] M. F. Stinski, "Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides," *Journal of virology*, vol. 26, no. 3, pp. 686-701, 1978.
- [233] G. Jahn, E. Knust, H. Schmolla, T. Sarre, J. A. Nelson, J. K. McDougall and B. Fleckenstein, "Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169," *Journal of virology*, vol. 49, no. 2, pp. 363-370, February 1984.
- [234] R. M. Stenberg, A. S. Depto, J. Fortney and J. A. Nelson, "Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region," *Journal of virology*, vol. 63, no. 6, pp. 2699-2708, June 1989.
- [235] R. M. Stenberg, P. R. Witte and M. F. Stinski, "Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1," *Journal of virology*, vol. 56, no. 3, pp. 665-675, December

---

1985.

- [236] M. C. Pizzorno, P. O'Hare, L. Sha, R. L. LaFemina and G. S. Hayward, "trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus," *Journal of virology*, vol. 62, no. 4, pp. 1167-1179, April 1988.
- [237] S. M. Otto, G. Sullivan-Taylor, C. L. Malone and M. F. Stinski, "Subcellular localization of the major immediate early protein (IE1) of human cytomegalovirus at early times after infection," *Virology*, vol. 162, no. 2, pp. 478-482, February 1988.
- [238] M. F. Stinski, D. R. Thomsen, R. M. Stenberg and L. C. Goldstein, "Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus," *Journal of virology*, vol. 46, no. 1, pp. 1-14, April 1983.
- [239] E. A. White and D. H. Spector, "Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation," *Journal of virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7438-7452, June 2005.
- [240] K. Straat, C. Liu, A. Rhabar, Q. Zhu, L. Liu, N. Wolmer-Solberg, F. Lou, Z. Liu, J. Shen, J. Jia, S. Kyo, M. Björkholm, J. Sjöborg, C. Söderberg-Nauclér and D. Xu, "Activation of telomerase by human cytomegalovirus," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 7, pp. 488-497, April 2009.
- [241] G. P. Hayhurst, L. Bryant, R. C. Caswell, S. M. Walker and J. H. Sinclair, "CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein," *Journal of virology*, vol. 69, no. 1, pp. 182-188, January 1995.
- [242] S. Pajovic, E. L. Wong, A. R. Black and J. C. Azizkhan, "Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins," *Molecular and cellular biology*, vol. 17, no. 11, pp. 6459-6464, November 1997.
- [243] A. D. Yurochko, T. F. Kowalik, S. M. Huong and E. S. Huang, "Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters," *Journal of virology*, vol. 69, no. 9, pp. 5391-5400, September 1995.
- [244] J. M. Cherrington, E. L. Khoury and E. S. Mocarski, "Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site," *Journal of virology*, vol. 65, no. 2, pp. 887-896, February 1991.
- [245] R. Schwartz, M. H. Sommer, A. Scully and D. H. Spector, "Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter," *Journal of virology*, vol. 68, no. 9, pp. 5613-5622, September 1994.
- [246] R. M. Stenberg, J. Fortney, S. W. Barlow, B. P. Magrane, J. A. Nelson and P. Ghazal, "Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains," *Journal of virology*, vol. 64, no. 4, pp. 1556-1565, April 1990.
- [247] E. Kieff, D. Given, A. L. Powell, W. King, T. Dambaugh and N. Raab-Traub, "Epstein-Barr virus: structure of the viral DNA and analysis of viral RNA in infected cells," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 560, no. 3, pp. 355-373, November 1979.
- [248] G. C. Faulkner, A. S. Krajewski and D. H. Crawford, "The ins and outs of EBV infection," *Trends in microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 185-189, April 2000.
- [249] G. Henle, W. Henle and V. Diehl, "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 59, no. 1, pp. 94-101, January 1968.
- [250] E. Maeda, M. Akahane, S. Kiryu, N. Kato, T. Yoshikawa, N. Hayashi, S. Aoki, N. Minami, H. Uozaki, N. Fukayama and K. Ohtomo, "Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review," *Japanese journal of radiology*, vol. 27, no. 1, pp. 4-19, January 2009.
- [251] E. Toussirof and J. Roudier, "Epstein-Barr virus in autoimmune diseases," *Best practice & resear. Clinical rheumatology.*, vol. 22, no. 5, pp. 883-896, October 2008.
-

- [252] A. Tselis, "Epstein-Barr virus cause of multiple sclerosis," *Current opinion in rheumatology*, vol. 24, no. 4, pp. 424-428, July 2012.
- [253] E. K. Flemington, A. E. Goldfeld and S. H. Speck, "Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis," *Journal of virology*, vol. 65, no. 12, pp. 7073-7077, December 1991.
- [254] T. Tsurumi, M. Fujita and A. Kudoh, "Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies," *Reviews in medical virology*, vol. 15, no. 1, pp. 3-15, January-February 2005.
- [255] C. Chen, D. Li and N. Guo, "Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors," *Cancer biology & therapy*, vol. 8, no. 11, pp. 987-995, June 2009.
- [256] B. Ruttkay-Nedecky, A. M. Jimenez Jimenez, L. Nejdil, D. Chudobova, J. Gumulec, M. Masarik, V. Adam and R. Kizek, "Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review)," *International journal of oncology*, vol. 43, no. 6, pp. 1754-1762, December 2013.
- [257] Clontech, MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 User Manual.
- [258] S. Fields and O. Song, "A novel genetic system to detect protein-protein interactions.," *Nature*, vol. 340, no. 6230, pp. 245-246, July 1989.
- [259] C. T. Chien, P. L. Bartel, R. Sternglanz and S. Fields, "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 88, no. 21, pp. 9578-9582, November 1991.
- [260] E. Ferro and L. Trabalzini, "The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signalling," *Plant molecular biology*, vol. 83, no. 4-5, pp. 287-301, November 2013.
- [261] B. E. Bernstein, E. L. Humphrey, R. L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J. S. Liu, T. Kouzarides and S. L. Schreiber, "Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 99, no. 13, pp. 8695-8700, June 2002.
- [262] H. Santos-Rosa, R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor and T. Kouzarides, "Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3," *Nature*, vol. 419, no. 6905, pp. 407-411, September 2002.
- [263] Y. Wang, R. Han, W. Zhang, Y. Yuan, X. Zhang, Y. Long and H. Mi, "Human CyP33 binds specifically to mRNA and binding stimulates PPIase activity of hCyP33," *FEBS letters*, vol. 582, no. 5, pp. 835-839, March 2008.
- [264] N. Agrawal and R. Banerjee, "Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation," *PloS One*, vol. 3, no. 12, p. e4032, 2008.
- [265] W. Zhou, H. Chen and L. Zhang, "The PcG protein hPc2 interacts with the N-terminus of histone demethylase JARID1B and acts as a transcriptional co-repressor," *BMB reports*, vol. 42, no. 3, pp. 154-159, March 2009.
- [266] E. J. Grow and J. Wysocka, "Flipping MLL1's switch one proline at a time," *Cell*, vol. 141, no. 7, pp. 1108-1110, June 2010.
- [267] D. Schraets, T. Lehmann, T. Dingermann and R. Marschalek, "MLL-mediated transcriptional gene regulation investigated by gene expression profiling," *Oncogene*, vol. 22, no. 23, pp. 3655-3668, June 2003.
- [268] P. Wei, M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer and K. A. Jones, "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA," *Cell*, vol. 92, no. 4, pp. 451-462, February 1998.
- [269] J. Peng, Y. Zhu, J. T. Milton and D. H. Price, "Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb," *Genes & development*, vol. 12, no. 5, pp. 755-562, March 1998.
- [270] J. Randjelović, S. Erić and V. Savić, "Computational study and peptide inhibitors design for the CDK9 - cyclin T1 complex," *Journal of molecular modeling*, vol. 19, no. 4, pp. 1711-1725, April

---

2013.

- [271] M. K. Jang, K. Mochizuki, M. Zhou, H. S. Jeong, J. N. Brady and K. Ozato, "The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription," *Molecular cell*, vol. 19, no. 4, pp. 523-534, August 2005.
- [272] Z. Yang, J. H. Yik, R. Chen, N. He, M. K. Jang, K. Ozato and Q. Zhou, "Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4," *Molecular cell*, vol. 19, no. 4, pp. 535-545, August 2005.
- [273] M. Barboric, R. M. Nissen, S. Kanazawa, N. Jabrane-Ferrat and B. M. Peterlin, "NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II," *Molecular cell*, vol. 8, no. 2, pp. 327-337, August 2001.
- [274] M. Gurumurthy, C. H. Tan, R. Ng, L. Zeiger, J. Lau, J. Lee, A. Dey, R. Philp, Q. Li, T. M. Lim, D. H. Price and S. H. Chao, "Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription," *Journal of molecular biology*, vol. 378, no. 2, pp. 302-317, April 2008.
- [275] J. H. Yik, R. Chen, R. Nishimura, J. L. Jennings, A. J. Link and Q. Zhou, "Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA," *Molecular cell*, vol. 12, no. 4, pp. 971-982, October 2003.
- [276] A. A. Michels, A. Fraldi, Q. Li, T. E. Adamson, F. Bonnet, V. T. Nguyen, S. C. Sedore, J. P. Price, D. H. Price, L. Lania and O. Bensaude, "Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor," *The EMBO journal*, vol. 23, no. 13, pp. 2608-2619, July 2004.
- [277] G. Park, Z. Gong, J. Chen and J. E. Kim, "Characterization of the DOT1L network: implications of diverse roles for DOT1L," *The protein journal*, vol. 29, no. 3, pp. 213-223, April 2010.
- [278] T. Lu, M. W. Jackson, B. Wang, M. Yang, M. R. Chance, M. Miyagi, A. V. Gudkov and G. R. Stark, "Regulation of NF-kappaB by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 107, no. 1, pp. 46-51, January 2010.
- [279] J. Goedhart, J. E. Vermeer, M. J. Adjobo-Hermans, L. van Weeren and T. W. J. Gadella, "Sensitive detection of p65 homodimers using red-shifted and fluorescent protein-based FRET couples," *PLoS one*, vol. 2, no. 10, p. e1011, October 2007.
- [280] P. A. Ganchi, S. C. Sun, W. C. Greene and D. W. Ballard, "A novel NF-kappa B complex containing p65 homodimers: implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization," *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 12, pp. 7826-7835, December 1993.
- [281] P. James, J. Halladay and E. A. Craig, "Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast," *PNAS*, pp. 1425-1436, December 1996.
- [282] J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge, "The p21 Cdk-Interacting Protein Cip 1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases," *Cell*, pp. 805-816, November 1993.
- [283] D. S. Holmes and M. Quigley, "A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids," *Analytical Biochemistry*, pp. 193-197, 1981.
- [284] F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Biochemistry*, pp. 5463-5467, December 1977.
- [285] C. Bendixen, S. Gangloff and R. Rothstein, "A yeast-mating selection scheme for detection of protein-protein interactions," *Nucleic Acids Research*, pp. 1778-1779, 1994.
- [286] R. L. Finley and R. Brent, "Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators," *PNAS*, pp. 12980-12984, December 1994.

## 9 ANHANG

### 9.1 LEBENSLAUF

### 9.2 PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

#### 9.2.1 PUBLIKATIONEN

Rössler T, Marschalek R. **An alternative splice process renders the MLL protein either into a transcriptional activator or repressor.** Pharmazie. 2013 Jul; 68(7):601-7

#### 9.2.2 VORTRÄGE

Scholz B, Rößler T, Benedikt A, Dingermann T, Marschalek R

**“The AF4/AF4-MLL interactome.”**

24. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung

Wilsede, 15.-18. Juni 2011

Rössler T, Scholz B, Dingermann T, Marschalek R

**“The protein-protein interaction network within human AF4 and AF4-MLL protein complexes.”**

25. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung

Wilsede, 6.-9. Juni 2012

Rössler T, Dingermann T, Marschalek R

**“An alternative splice process renders the MLL protein either into an transcriptional activator or repressor.”**

26. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung

Wilsede, 5.-8. Juni 2013

Marschalek R, Scholz B, Roessler T, Mück F, Meyer C

**“Super elongation complexes and MLL-rearranged leukemias: hitting the point.”**

9th Biennial Childhood Leukemia Symposium

Prag, 28.-29. April 2014

---

### 9.3 DANKSAGUNG

### 9.4 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

#### ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den .....  
(Unterschrift)

#### Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über  
.....  
.....  
.....

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

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt am Main, den .....  
(Unterschrift)