

Untersuchungen zu
pathomolekularen Funktionen
von t(4;11) Fusionsproteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von

Anna Lena Siemund

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2021

D30

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter : Prof. Rolf Marschalek
2. Gutachter : Prof. Robert Fürst

Datum der Disputation :

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Blutsystem und die Hämatopoese	1
1.2 Krebserkrankungen in Deutschland	3
1.3 Leukämien im Allgemeinen	4
1.3.1 Epidemiologie von Leukämietypen	5
1.3.2 Die Rolle von genetischen Aberrationen bei der Entstehung von Leukämien	7
1.4 <i>MLL</i> -r assoziierte Leukämien	8
1.4.1 Die Wildtypproteine MLL und AF4	11
1.4.2 t(4;11)(q21;23) Translokation	18
1.4.3 Die Herausforderung von t(4;11) Modellsystemen	21
1.5 Der Nukleolus – Ort der Ribosomenbiogenese	23
1.5.1 Aufbau des Nukleolus	23
1.5.2 Die rRNA Transkription	26
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 Organismen, Materialien & Methoden	30
2.1 Organismen	30
2.1.1 Humane Zelllinie	30
2.1.2 Bakterienstämme	30
2.2 Materialien	31
2.2.1 Vektoren	31
2.2.2 Starteroligonukleotide	33
2.2.3 Medien & Lösungen	34
2.2.4 Antikörper	38
2.2.5 Enzyme & Kits	38
2.2.6 Geräte	39
2.2.7 Chemikalien	40
2.2.8 Verbrauchsmaterialien & Sonstiges	41
2.3 Zellbiologische Methoden	42
2.3.1 Kultivierung & Passagierung	42
2.3.2 Zellzahlbestimmung & Viabilitätsmessung	43
2.3.3 Transfektion	43
2.3.4 Proliferationsstudien	45
2.3.5 ATP-Messung	46
2.3.6 Zellzyklusanalyse	46
2.3.7 Promotoraktivitätsstudien	47
2.3.8 Quantifizierung der Proteinbiosynthese	48
2.3.9 Kryokonservierung	49

2.4	Molekularbiologische Methoden	49
2.4.1	Standardmethoden	49
2.4.2	DNA-Sequenzierung nach Sanger	49
2.4.3	RNA Techniken	50
2.4.4	Quantitative Real Time-PCR (qPCR)	51
2.4.5	Massive Analysis of cDNA Ends (MACE)	52
2.5	Proteinbiochemische Methoden	53
2.5.1	Gesamtproteinextraktion	53
2.5.2	Proteingehalt- & Konzentrationsbestimmung	54
2.5.3	Histonextraktion	54
2.5.4	Proteinauftrennung & Immunologischer Proteinnachweis	54
2.5.5	Co-Immunopräzipitation (CoIP)	56
2.5.6	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	56
2.5.7	Polysomenprofilierung	58
2.6	Sequenzvergleich der pSer Domänen von Mensch und Maus	59
2.7	Mikroskopie	59
2.7.2	Fluoreszenzanregung	60
2.7.3	Zellfixierung auf Objektträgern	60
2.7.4	Fluoreszenzbasierte Antikörperdetektion an fixierten Zellen	61
2.7.5	Fluoreszenzbasierte Quantifizierung des UBF Proteinlevels	61
2.8	Datenauswertung & Statistik	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Generierung stabiler t(4;11)-Fusionsgen exprimierender HEK 293T Zellen	62
3.1.1	Klonierungsstrategie des chimären D11m in pSBtet_B	62
3.1.2	Sequenzvergleich zwischen D11 & dem chimären D11m	63
3.1.3	Stabile Transfektion & Expressionsnachweis	64
3.1.4	Viabilität von t(4;11) fusionsgenexprimierenden HEK 293T Zellen	69
3.2	Einfluss von D11m auf das MLL Zielgen <i>HOXA9</i>	70
3.3	Analyse der Genexpression der t(4;11) exprimierenden Zelllinien mittels MACE	71
3.4	Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf den Nukleolus und die Ribosomenbiosynthese	75
3.4.1	Interaktion der humanen und murinen pSer Domäne mit dem SL1-Komplex	75
3.4.2	Lokalisationsstudien	77
3.4.3	Änderung der nukleolären Morphologie durch D11::mCh & D11m::mCh	83
3.4.4	Einfluss auf die rRNA Transkription & die ribosomale RNA	84
3.4.5	Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Ribosomen	92
3.5	Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Proteintranslation	96
3.6	Studien zum Energiehaushalts & Metabolismus in Abhängigkeit der t(4;11) Fusionsproteine	98

3.7	Interaktion der t(4;11) Fusionsproteine mit dem Wnt Signalweg	100
3.7.1	Überprüfung des p53 Proteinlevels	100
3.7.2	Überprüfung des β -Catenin Proteinlevels	101
3.7.3	Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die <i>HOXB4</i> Expression	102
3.8	Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf H3-Modifikationen im Gesamthistonextrakt	103
4	Diskussion	106
4.1	Beeinträchtigung der Ribosomenbiogenese durch MLL-AF4	106
4.2	MLL-AF4 vermittelte Grenzüberschreitung zwischen Nukleus und Nukleolus	114
4.3	Ribosomenbiogenese als Therapieziel	117
4.4	Nutzung chimärer Fusionsproteine zur Verbesserung von t(4;11) Modellsystemen	122
5	Literaturverzeichnis	125
6	Abbildungsverzeichnis	161
7	Tabellenverzeichnis	164
8	Vektorkarten	165
8.1	Klonierungsvektor	165
8.2	Transposasevektor	165
8.3	<i>Sleeping Beauty</i> Vektoren	166
8.4	Luciferase-Reportervektoren	171
9	Beitrag zur SARS-CoV2 Forschung	173
10	Danksagung	174
11	Erklärung	175
12	Anhang	176
12.1	Akademischer Lebenslauf	176
12.2	Publikationen, Präsentationen & Poster	177

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
aa, AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AEP	AF4/ENL/pTEFb Komplex
Akt D	Aktinomycin D
ALF	AF4, LAF4 und FMR-2 Familie
ALL	Akut lymphatische Leukämie
AML	Akut myeloische Leukämie
BCR	Bruchpunktsregion (<i>break point cluster region</i>)
bp	Basenpaar
ca.	circa
CE	<i>core element</i> des rRNA Promotors
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHX	Cycloheximid
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CoIP	Co-Immunopräzipitation
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwertzyklus)
CTD	C-terminalen Domäne
D11	Derivat 11 (MLL-AF4)
D11m	Derivat 11 mit murinisierte pSer Domäne (MLL-AF4(murine pSer))
D4	Derivat 4 (AF4-MLL)
DCAL	Diagnostic Center for Acute Leukemias
DFC	<i>dense fibrillar component</i> des Nukleolus
<i>et al.</i>	Lateinisch für „unter anderen“
FC	<i>fibrillar center</i> des Nukleolus
FP	Fusionsprotein
g	Gramm
GC	<i>granular component</i> des Nukleolus
GOI	<i>gene of interest</i>
h	Stunden
hpSer	Humane pSer Domäne
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IGS	<i>intergenic spacer</i>
IRBC	<i>Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint</i>
kb	Kilobasenpaar

l	Liter
mA	Milliampere
mCh	mCherry (rot fluoreszierender Protein <i>tag</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
<i>MLL-r</i>	MLL-Rearrangement
mM	Millimolar
<i>mock</i>	Leervektorkontrolle
mpSer	Murine pSer Domäne
MQ	RNase-freies-„Milli-Q“ Wasser
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NP-40	Nonylphenoethoxylat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIC	Präinitiationskomplex
pmol	Pikomol
Pol I	RNA Polymerase I
Pol II	RNA Polymerase II
Pol III	RNA Polymerase III
qPCR	Quantitative PCR
rDNA	Ribosomale DNA
RiBi	Ribosomenbiogenese
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
SEC	Superelongations-Komplex
sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
<i>tag</i>	Markierung
t-ALL	therapieinduzierte ALL
TPG	Translokationspartnergen
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Triton™ X-100	(p-tert-Octylphenoxy) Polyethoxyethanol
TSS	Transkriptionsstartseite
Tween® 20	Polyoxyethylen-20-Sorbitan-Monolaurat
UE	<i>upstream element</i> des rRNA Promotors
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

Zusammenfassung

Die t(4;11) Pro-B-Leukämie tritt vornehmlich bei Kleinkindern auf. Wegen ihrer schlechten Prognose und schwierigen Therapierbarkeit, auch bedingt durch einen Mangel an adäquaten Modellsystemen, gilt sie als Hochrisiko-Leukämie (Lavau, 1997; Pui *et al.*, 2002; Pui & Evans, 2006; Chen *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008a; Pui *et al.*, 2011). Sie entsteht durch eine chromosomale Translokation zwischen dem *MLL* und dem *AF4* Gen. Dadurch entstehen die beiden Fusionsgene *MLL-AF4* (*D11*) und *AF4-MLL* (*D4*). Die entsprechenden Fusionsproteine führen zu einer Deregulierung der Genexpression und können letztlich eine Leukämie auslösen (Tkachuk, Kohler, & Cleary, 1992; Waring & Cleary, 1997; Bardini *et al.*, 2011).

Für D11 konnte im Jahre 2016 ein neuer Mechanismus zur Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase II (Pol II) identifiziert werden. Dabei rekrutiert die pSer Domäne des AF4-Parts von D11 den RNA-Polymerase I (Pol I) Transkriptionsinitiationsfaktor SL1 und nutzt diesen zur Initiation der Transkription von *MLL*-Zielgenen durch die Pol II (Okuda *et al.*, 2015). Des Weiteren konnte durch den Austausch der humanen Sequenzen des AF4-Parts in D11 mit der murinen Sequenz in hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) ein neues Modellsystem generiert werden, welches den Pro-B-Phänotyp in verbesserter Weise darstellen konnte (Lin *et al.*, 2016). Auf diesen beiden Veröffentlichungen aufbauend sollten im Rahmen dieser Arbeit die molekularen Auswirkungen der Interaktion der t(4;11) Fusionsproteine, einschließlich eines murinisierten D11 mit muriner pSer Domäne (D11m), mit dem SL1 Komplex untersucht werden.

- Mit Hilfe des *Sleeping Beauty* Transpositionssystemes wurden sechs induzierbare, stabile HEK 293T Zelllinien mit folgenden Transgenen generiert: Leervektorkontrolle (*mock*); D4; D11; D11m; D4+D11; D4+D11m
- Die 48 stündige Expression der Transgene übte keinen Effekt auf die Viabilität der Zelllinien aus
- D11 und D11m zeigten keinen Unterschied in der Aktivierung des *MLL* Zielgenes *HOXA9*
- Genexpressionsstudien wurden mittels MACE-Seq durchgeführt
- Für die murine pSer Domäne konnte durch CoIP Versuche eine schwache Interaktion mit SL1 nachgewiesen werden
- Fluoreszenzgekoppelte mikroskopische Lokalisationsstudien ergaben eine nukleoläre Lokalisation von D11 und D11m, sowie eine D11 abhängige co-Lokalisierung der Pol II im Nukleolus. Zusätzlich führte die Expression von D11 und D11m zu einer Änderung der Morphologie der Nukleoli

- D11 und D11m übten in einem Luciferase-Reportersystem einen reprimierenden Effekt auf die rRNA Promotoraktivität, sowie in einem Proteinsyntheseassay auch auf die Proteintranslation aus. Beide Effekte konnten durch die transiente Expression von TAF_IC::GFP (Komponente von SL1) kompensiert werden
- Trotz der Reduktion der rRNA Promotoraktivität konnte in D11-, bzw. D11m exprimierenden Zellen eine Erhöhung der rRNA Menge mittels qPCR gemessen werden
- Die Transgeneexpression übte keinen Effekt auf die Prozessierung der rRNA, sowie auf die Konstitution der ribosomalen Untereinheiten aus
- Die Expression von D11, bzw. D11m führte zu einer Erhöhung des p53, sowie des β -Catenin Proteinlevels

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zur Interaktion von MLL-AF4 (D11) – via SL1 – mit dem Prozess der Ribosomenbiogenese (RiBi) deuten auf einen neuen, weitgreifenden Pathomechanismus hin, der zur Komplexität der t(4;11) Leukämie beiträgt.

1 Einleitung

1.1 Das Blutsystem und die Hämatopoese

Das Blutsystem des Menschen ist ein flüssiges Organ und besteht zu ca. 45 % aus einer zellulären Komponente, dem Hämatokrit und zu ca. 55 % aus einer wässrigen Komponente, dem Plasma. Das Blutplasma setzt sich überwiegend aus Wasser und darin gelösten Salzen, Proteinen und niedermolekularen Substanzen zusammen. Der Hämatokrit hingegen besteht aus verschiedenen Zelltypen, die sich anhand ihrer Funktion in drei Klassen unterteilen lassen. Die Erythrozyten, welche den Gasaustausch und Transport von O₂ und CO₂ ermöglichen, verschiedene Formen von Leukozyten die sowohl zum angeborenen, als auch zum erworbenen Immunsystem gehören und Megakaryozyten als Vorläuferzellen der Thrombozyten, die der Blutgerinnung dienen. Zu den Aufgaben des Blutsystems gehört die Regulation der pH-, sowie der Temperaturhomöostase, die Bekämpfung von Pathogenen und der Transport von Metaboliten und Anaboliten.

Da es sich beim Blut um das regenerativste Gewebe des Körpers handelt und die verschiedenen Blutzellen eine begrenzte Lebensdauer von einigen Tagen bis mehreren Wochen besitzen, müssen diese kontinuierlich nachgebildet werden (Orkin & Zon, 2002, 2008; Doulatov *et al.*, 2012). Alle Zelltypen stammen von einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) ab und werden bei Erwachsenen vornehmlich im roten Knochenmark produziert (Maximow, 1909; Becker, McCulloch, & Till, 1963; Till & McCulloch, 2012). Täglich werden etwa eine Billion (10^{12}) Blutzellen neu gebildet.

Den Prozess der Blutzellbildung nennt man Hämatopoese. Dabei differenzieren sich HSZ stufenweise, über multi- und oligopotente Vorläuferzellen, zu reifen Blutzellen aus. Diese Entwicklung teilt sich je nach zu bildendem Zelltyp in die myeloische und die lymphatische Blutzelllinie (Abb. 1.1).

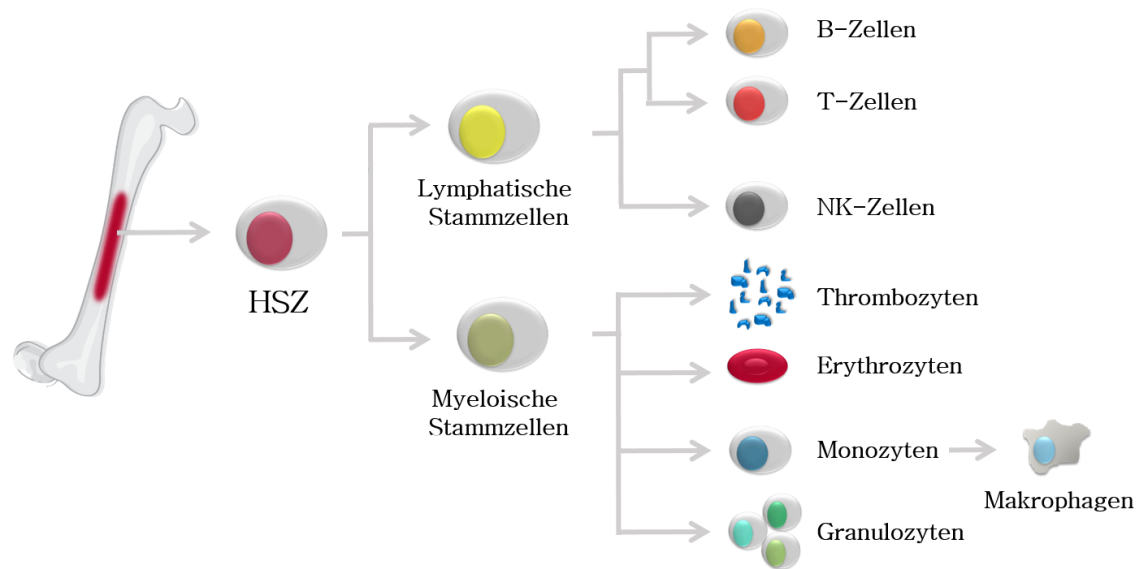


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Hämatopoese. Im roten Knochenmark werden von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) myeloische und lymphatische Stammzellen gebildet. Diese differenzieren sich in die verschiedenen Zelltypen des Blutsystems. Zur lymphatischen Linie gehören B- und T-Zellen, sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die myeloische Linie hingegen generiert Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten (neutrophil, basophil, eosinophil).

Bei der Bildung lymphatischer Zellen, auch Lymphopoese genannt, werden B-, T- und NK-Zellen aus einer lymphatischen Stammzelle gebildet. Die Reifung bzw. Fortentwicklung von B- und T-Zellen findet auch außerhalb des Knochenmarks statt. Bei T-Zellen vorrangig im Thymus und bei B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen. Sie sind wichtige Komponenten des adaptiven Immunsystems und kooperieren im Rahmen der Immunantwort miteinander, sowie mit weiteren Zelltypen der myeloischen Linie. Für sie dient das Blut als Transportbahn um zu Infektionsherden zu gelangen.

Die Myelopoese findet ausschließlich im roten Knochenmark statt. Bei der Ausdifferenzierung myeloischer Blutzellen werden Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und drei Arten an Granulozyten gebildet. Diese Linie ist von der Funktion der von ihr gebildeten Zellen sehr divers. Vorrangig werden Erythrozyten gebildet. Diese nukleusfreien Zellen stellen die Hauptkomponente des Blutes dar. Ihr Wirkort ist die Blutbahn in der sie über die Bindung an Hämoglobin O_2 von der Lunge ins Gewebe und CO_2 vom Gewebe zurück zur Lunge transportieren. Dieses ist ebenso für die rote Farbe des Blutes verantwortlich.

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung von Megakaryozyten und besitzen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Durch Pseudopodien initiierte Aggregation an verletzten Blutgefäßen kommt es, als ersten Schritt der

Blutgerinnung, zur Bildung eines Thrombus. Thrombozyten haben eine Lebensdauer von 5-7 Tagen.

Monozyten (Makrophagen und ihre spezialisierten Derivate) gehören sowohl zum unspezifischen als auch zum spezifischen Immunsystem und werden überwiegend in der Milz gespeichert (Swirski *et al.*, 2009). Ihre Funktion ist die Eliminierung körperfremder Stoffe durch Phagozytose. Des Weiteren aktivieren sie die erworbene Immunantwort durch Antigenpräsentation. Sie können die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern wo sie sich zu Makrophagen differenzieren.

Die letzte Gruppe der myeloischen Linie sind die Granulozyten. Diese werden anhand ihrer Anfärbbarkeit in saure (eosinophil), basische (basophil) und neutrale (neutrophil) Granulozyten unterschieden. Sie sind vor allem an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt. Neutrophile Granulozyten machen die größte Granulozytenpopulation aus und dienen der Phagozytose von Mikroorganismen. Eosinophile Granulozyten wehren Parasiten ab. Zudem wird ihre Anzahl beim Auftreten von Allergien erhöht. Basophile Granulozyten hingegen sind die kleinste Fraktion und können im Zuge von Allergien z.B. Histamin freisetzen.

Die Komposition der einzelnen Blutzelltypen wird vom Körper sehr komplex reguliert und die Zusammensetzung kann sich durch äußere, wie innere Einflüsse ändern. Ist der Körper hingegen nicht mehr in der Lage die Hämatopoese zu regulieren, kann es zum Auftreten einer Blutkrankheit, wie beispielsweise einer Anämie, oder einer Leukämie kommen.

1.2 Krebserkrankungen in Deutschland

Die Anzahl an Menschen mit Krebsneuerkrankungen pro Jahr ist in Deutschland seit den 1970er Jahren um fast das Doppelte gestiegen (Barnes *et al.*, 2016). Dies ist hauptsächlich, aber nicht nur, auf den demografischen Wandel und die damit einhergehende Alterung der Bevölkerung zurückzuführen. Dem entgegensteht, dank einer verbesserten Früherkennung und neuer Therapiemöglichkeiten, eine seit den 1990er Jahren steigende Krebsüberlebensrate. Im Jahre 2013 erkrankten rund 483.000 Menschen in Deutschland an einer Form von Krebs. Die häufigsten Krebsarten in der Bevölkerung sind Brustdrüsen-, Dick- und Enddarm-, Prostata- und Lungenkrebs (Abb. 1.2A). Sie machen über 50 % aller Krebsarten aus. Leukämieerkrankungen haben in der Gesamtbevölkerung einen Anteil von 2,78 %.

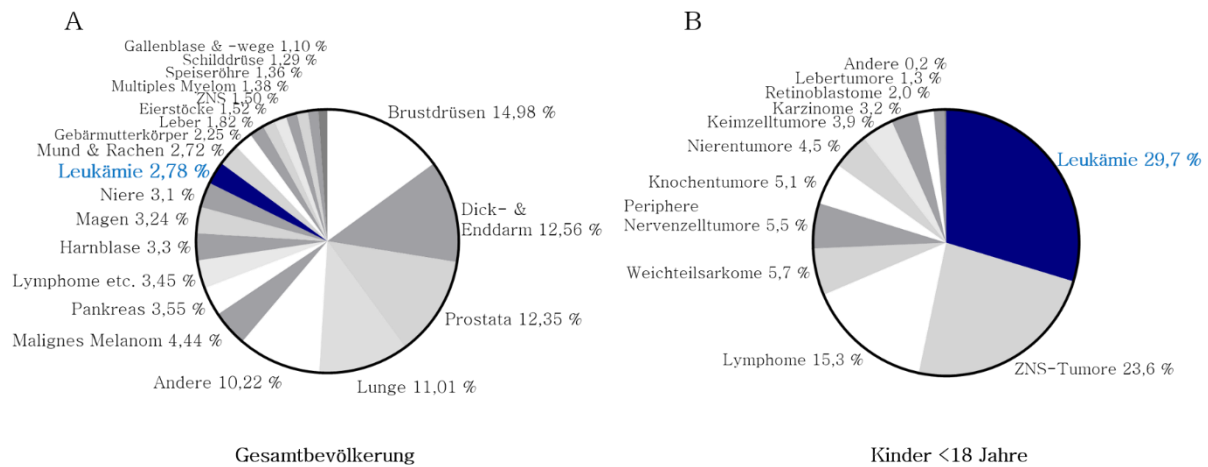


Abb. 1.2 Arten & Anteile von Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Angegeben sind prozentuale Anteile verschiedener Krebsarten bei Krebsneuerkrankungen. Im Jahre 2013 wurden in Deutschland 482.470 Krebsneuerkrankungen gemeldet. (A) Etwa 50 % der Krebsdiagnosen innerhalb der Gesamtbevölkerung sind Brustdrüsen-, Darm-, Prostata- und Lungenkrebs. (B) Bei Kindern unter 18 Jahren stellen Leukämien, Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) und Lymphome über 60 % der Krebsdiagnosen dar. Übernommen von Barnes *et al.*, 2016

Zwischen 2009 und 2014 erkrankten durchschnittlich etwa 2.095 Kinder (unter 18 Jährige) in Deutschland an Krebs (Barnes *et al.*, 2016). Betrachtet man nun hingegen die Häufigkeiten verschiedener Krebserkrankungen im Kindesalter verändern sich die Anteile, verglichen mit der Gesamtbevölkerung, erheblich (Erdmann *et al.*, 2020). Zu gut 2/3 werden diese von Leukämien (29,7 %), Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS, 23,6 %) und Lymphomen (15,3 %) dominiert (Abb. 1.2B). Mit knapp 30 % stellen Leukämien hier die größte Gruppe dar.

1.3 Leukämien im Allgemeinen

Als Leukämie, umgangssprachlich Blutkrebs genannt, bezeichnet man eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Durch die Entartung von hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen kommt es zur unkontrollierten Vermehrung von unreifen Leukozyten. Dies führt zur Beeinträchtigung von Lymphopoese, sowie Myelopoese. Der gesamte Prozess der Hämatopoese gerät aus dem Gleichgewicht und alle Komponenten des Blutsystems werden in ihrer Funktion gestört. Im Gegensatz zu soliden Tumoren gelangen die entarteten Zellen, auch leukämische Blasten genannt, aus dem Knochenmark über das periphere Blut in das lymphatische System und können sich so im gesamten

Körper verteilen. Bei einem an Leukämie erkrankten Patienten treten Symptome wie Müdigkeit, Kurzatmigkeit, Blässe und Kälteintoleranz, einhergehend mit einer allgemeinen Immunschwäche, auf. Diagnostiziert werden kann eine Leukämie durch die Analyse des Blutbilds. Die Gesamtzahl an Leukozyten ist deutlich erhöht und zusätzlich können eine Anämie, ein Mangel an Erythrozyten, sowie ein Mangel an Thrombozyten, eine Thrombozytopenie vorliegen.

Je nach zeitlichem Verlauf werden Leukämien als akut oder chronisch eingestuft. Während bei akuten Leukämien deutliche Symptome innerhalb von wenigen Wochen auftreten, kann dies bei chronischen Leukämien über Jahre hinweg dauern. Ein weiteres Kriterium zur Einteilung ist der Ursprung der entarteten Zelle. Diese kann entweder aus der myeloischen, oder der lymphatischen Zelllinie stammen. Insgesamt lassen sich Leukämien somit in vier Typen gliedern (Pschyrembel, Witzel, & Dornblüth, 2007; Tortora, Derrickson, & Pries, 2008).

- Akut lymphatische Leukämie (ALL)
- Akut myeloische Leukämie (AML)
- Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)
- Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die *European Group for the Immunological Classification of Leukemias* (EGIL) klassifiziert akute Leukämien weiter anhand ihres Immunophänotyps, entsprechend ihres Differenzierungsgrades, in die Subtypen myeloisch, T- und B-Zelllinie, oder biphänotypisch (Bene *et al.*, 1995; Hoelzer & Gokbuger, 2002). In 75 % der Erwachsenen-ALL Fälle handelt es sich um B-Zell-Leukämien (Pro-B, Prä-B, *common* und *mature* ALL). Entsprechende Oberflächenmarker sind CD19, CD20, CD22, CD24, und CD79a (Huh & Ibrahim, 2000). Die anderen 25 % stellen T-Zell-Leukämien mit den Markern CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 und CD8 dar. Beide Typen können zusätzlich den Stammzellmarker CD34 exprimieren. Dieser ist diagnostisch von keinerlei Relevanz, kann aber prognostisch wertvoll sein (De Waele *et al.*, 2001). Bei biphänotypischen Leukämien können die leukämischen Blasten sowohl T-Zell-, als auch B-Zell-Marker exprimieren.

1.3.1 Epidemiologie von Leukämietypen

Im Jahre 2016 erkrankten in Deutschland geschätzt 13.900 Personen, davon 6010 Frauen und 7900 Männer an einer Leukämie (Robert Koch-Institut & Epidemiologisches Krebsregister in Deutschland e.V, 2019). Etwa 4 % der

Erkrankten waren unter 15 Jahre alt. Das Risiko einer Erkrankung reduziert sich im Laufe des Alters bis zum ca. 30. Lebensjahr und steigt danach wieder an. Insgesamt entspricht das einer Erkrankungsrate von 8,6 für Frauen und 13,5 für Männer je 100.000 Einwohner¹. Die Inzidenzrate ist damit bei Männern höher als bei Frauen. Die Sterberaten lagen bei 4,0 und 6,6 je 100.000 Personen¹ (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2017). In 2016 war mit ca. 38 % die Mehrheit aller diagnostizierten Leukämien eine CLL und mit etwa 23 % eine AML. Bei den unter 15 Jährigen sind die ALL, vom Deutschen Kinderkrebsregister als lymphatische Leukämien bezeichnet, mit 24,9 % die verbreitetste Leukämieform (Kaatsch, Grabow, & Spix, 2018). Sie tritt vor allem bei den unter 5 Jährigen mehr als zweifach häufiger auf als in anderen Altersgruppen (Abb. 1.3). Die generelle Langzeitüberlebensrate ist mit 90 % gut. Die deutlich seltener auftretende AML weist bei Kindern eine schlechtere Langzeitüberlebensrate von 71 % auf.

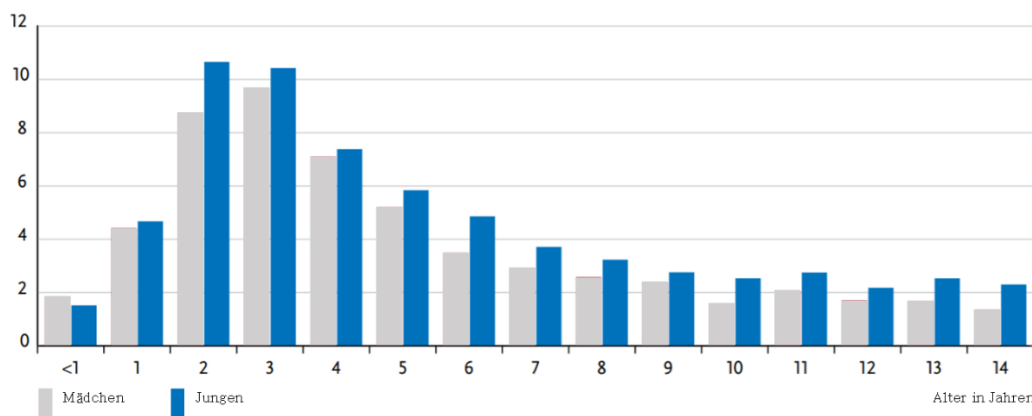


Abb. 1.3 Verteilung Akut lymphatischer Leukämien nach Alter und Geschlecht. Neuerkrankungsrate von Akut Lymphatischen Leukämien (ALL) bei Kindern pro 100.000 Einwohnern, ermittelt aus den Jahren 2008– 2017. Übernommen von Robert Koch-Institut und Epidemiologisches Krebsregister in Deutschland e.V., 2019

Einen Sonderfall stellen akute Leukämien bei Kindern mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) dar. Das Risiko eine ALL zu entwickeln ist bis zu 30-fach und bei AML sogar bis zu 150-fach höher als bei Kindern ohne Trisomie 21 (Hasle, Clemmensen, & Mikkelsen, 2000). Die AML bei Patienten mit Down-Syndrom (AML-DS) zeichnet sich durch distinkte genetische Eigenschaften aus. Die Leukämie entwickelt sich in der Regel vor dem 5. Lebensjahr und ihr voraus geht ein klonales, neonatales und präleukämisches Syndrom, bekannt als

¹ Die Altersstandardisierung je 100.000 Einwohner/Personen ermöglicht es, Erkrankungsdaten aus Bevölkerungen unterschiedlicher Altersstruktur zu vergleichen, angewandt vom Robert Koch Institut im Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016

Transient-Abnormale-Myelopoese (TAM). Dieses ist für Trisomie 21 einzigartig. Dieser präleukämische Zustand zeichnet sich zum einen durch die bei Trisomie 21 generell erhöhte Proliferation von megakaryozytischen Vorläuferzellen in der fetalen Leber, zusammen mit einer auftretenden Mutation im Gen für das *GATA binding protein* (*GATA1*) aus (Rainis *et al.*, 2003). Zur Ausbildung einer AML benötigt es dann eine weitere Mutation die oftmals im *Cohesin* Gen, oder einem Gen für einen epigenetischen Regulator auftritt (Nikolaev *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2013).

Zu den Risikofaktoren und Ursachen, die zur Entstehung einer Leukämie führen können keine allgemein gültigen Faktoren benannt werden. Allerdings können Umwelteinflüsse wie ionisierende Strahlung und der Kontakt mit Chemikalien wie beispielsweise Benzol und 1,3 Butadien zur Entstehung einer akuten Leukämie beitragen. Auch Chemotherapien zur Behandlung anderer Krebserkrankungen können eine sogenannte therapieinduzierte ALL (t-ALL) verursachen (Meyer *et al.*, 2018). Des Weiteren können verschiedene Mutationen, allem voran genetische Aberrationen, mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Leukämie einhergehen.

1.3.2 Die Rolle von genetischen Aberrationen bei der Entstehung von Leukämien

Neben Punktmutationen können auch genetische Aberrationen Leukämien auslösen (Szczyptański, Harrison, & van Dongen, 2010). Als genetische Aberration, oder Chromosomenaberration, werden Veränderungen der Chromosomen bezeichnet. Man unterscheidet dabei zwischen numerischen Aberrationen, welche Aneuploidien oder Polyploidien und strukturellen Aberrationen, die Deletionen, Insertionen, Inversionen, Duplikationen und Translokationen verursachen.

Zu Ersteren gehören Änderung in der Anzahl einzelner Chromosomen (bspw. Monosomien oder Trisomien), während bei Polyploidien ganze Chromosomensätze vervielfältigt vorliegen (z.B. Triploidie). Bei strukturellen Chromosomenaberrationen handelt es sich hingegen um Veränderungen innerhalb einzelner, oder einiger weniger Chromosomen. So können Abschnitte eines Chromosoms fehlen (Deletion), ein Genabschnitt aus einem anderen Locus eingefügt werden (Insertion), die Orientierung eines Genabschnitts geändert, oder dupliziert werden (Inversion, Duplikation), oder Genabschnitte, nach DNA-Doppelstrangbrüchen, zwischen zwei nicht homologen Chromosomen, oder innerhalb eines Chromosoms ausgetauscht werden (Translokation). Substanzen, die numerische Chromosomenaberrationen verursachen können, werden als aneugen und welche, die strukturellen Veränderungen erzeugen, als klastogen bezeichnet. Solche entarteten Zellen verhalten sich anders als nicht entartete Zellen

hinsichtlich Proliferation, Stoffwechsel und Migration. Sie werden in der Regel entweder vom Immunsystem erkannt und eliminiert oder initiieren selbst den Prozess der Apoptose. Diese mutierten Zellen können jedoch in seltenen Fällen unerkant und unbeeinflusst bleiben, was zur Entstehung einer Krebserkrankung führen kann.

Chromosomale Translokationen treten gehäuft bei Leukämien auf und nahezu alle hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren sind in solche involviert (Rosenbauer & Tenen, 2007; Orkin & Zon, 2008). Die chimären Fusionsproteine deregulieren die Expression von Zielgenen, inhibieren die Funktion anderer essentieller Faktoren, oder rekrutieren alternative chromatinmodifizierende Enzyme. Die 1960 erste identifizierte Translokation die zu einer CML führte ist die t(9;22) (q34;q11)-Translokation (Nowell & Hungerford, 1960; Randolph, 2005). Sie ist als Philadelphia-Chromosom bekannt. Bei dieser reziproken Translokation kommt es zur Fusion des *BRC* Gens auf Chromosom 22 und dem *ABL* Gen auf Chromosom 9. Das onkogene BCR-ABL Fusionsprotein stimuliert die Tyrosinkinaseaktivität des ABL-Proteins kontinuierlich (Tefferi *et al.*, 2005). Die Folge ist eine erhöhte Aktivierung von Signalkaskadenkomponenten wie bspw. der Phosphoinositid-3-Kinase und führt zu einer enthemmten Proliferation granulopoetischer Zellen (Kharas & Fruman, 2005; Virgili *et al.*, 2008).

In der Regel ist zur Krebsentstehung eine Anhäufung von Mutationen über die Zeit notwendig. Dies gilt besonders für solide Tumore. Auch bei translokationsbasierten Leukämien sind Sekundärmutationen zu finden. Eine Ausnahme bilden *MLL*- (*mixed lineage leukemia*)-r-basierte Leukämien. Unter Beteiligung des *MLL* Gens reicht bereits eine genetische Aberration aus um eine Leukämie zu initiieren (Ayton & Cleary, 2001; Bursen *et al.*, 2010; Szczepański *et al.*, 2010). Dies konnte anhand von Genomsequenzierungen bestätigt werden (Andersson *et al.*, 2015). Dabei wiesen Säuglinge mit *MLL*-r induzierter ALL mit 1,3 die niedrigste Rate an somatischen Mutationen auf.

1.4 *MLL*-r assoziierte Leukämien

MLL-r assoziierte Leukämien stellen eine besonders aggressive und schwer therapierbare Form der Leukämien dar. Chromosomale Translokationen mit involviertem *MLL* Gen generieren Fusionsgene mit über 79 verschiedenen Translokationspartnern (TPG) (Djabali *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 2018). Sie stellen mit 5–10 % aller akuten Leukämien die größte Kohorte dar (Dimartino & Cleary, 1999; Marschalek, 2011). Bei den Leukämien unter Säuglingen tragen bis zu 80 % aller ALL und ca. 60 % aller AML eine Veränderung des *MLL* Gens (Greaves, 1996; Taki *et al.*, 1996; Pui *et al.*, 2011). Der Ursprung der Aberration liegt oftmals pränatal

in utero (Gale *et al.*, 1997; Greaves, 2005). Des Weiteren gibt es im Rahmen von Chemotherapien mit Topoisomerase II Inhibitoren ein 2 – 15 %iges Risiko einer MLL-assoziierten t-ALL (Super *et al.*, 1993; Felix, 1998, 2001). Die DNA-Doppelstrangbrüche treten beim *MLL* Gen gehäuft in einer Region zwischen Exon 9 und Intron 12 auf, der sogenannten Bruchpunktsregion (*break point cluster region*, BCR). Diese Region weist potentielle Bindestellen für Topoisomerase II auf und zeigte eine Sensitivität gegenüber DNase I (Aplan *et al.*, 1996; Strissel *et al.*, 1998). In einer Studie an 545 Kleinkindern mit akuter Leukämie konnte gezeigt werden, dass die genaue Lokalisation des *MLL*-Bruchpunktes als prognostischer Marker genutzt werden kann (Emerenciano *et al.*, 2013). Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einem Bruchpunkt im Intron 11 einen schwereren Krankheitsverlauf aufwiesen. Etwa 93,5 % der *MLL*-r Bruchpunkte liegen innerhalb der BCR (Meyer *et al.*, 2018). Da die Brüche, auch bei den TPG, wie beispielsweise dem *AF4*- Gen, vorzugsweise in Introns liegen, führt die Translokation zu Fusionsgenen mit intaktem Leserahmen (Gu *et al.*, 1992; Nilson *et al.*, 1997; Marschalek *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999). Das Produkt sind Fusionsproteine mit onkogenem Charakter.

Das am Institut für Pharmazeutische Biologie ansässige *Diagnostic Center for Acute Leukemias* (DCAL) identifiziert Bruchpunkte und TPG des *MLL* auf molekularer Ebene. Von den bis 2017 untersuchten *MLL*-r Leukämiepatienten konnten bisher 103 TPG des *MLL* identifiziert werden (DCAL Datenbank, Stand April 2021). Die prominentesten TPG waren mit 36 % *AF4*, 19 % *AF9*, 13 % *ENL*, 8 % *AF10* (Abb. 1.4).

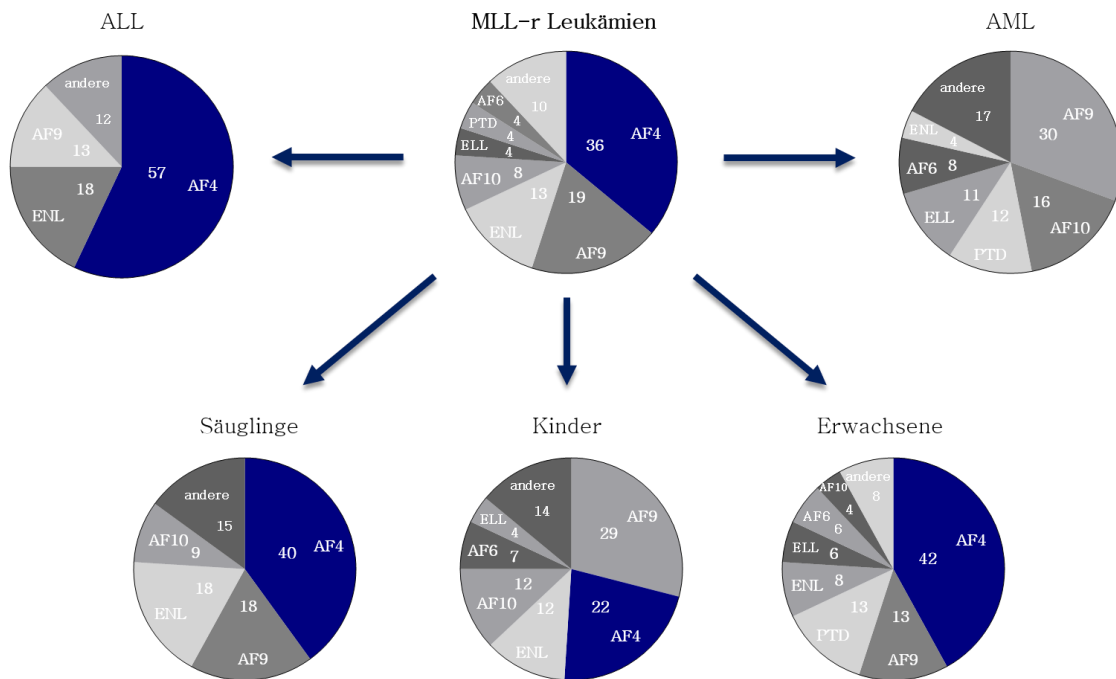


Abb. 1.4 Translokationspartnergene in MLL Rearrangements und die Verteilung nach Altersgruppen. Anhand der genomischen DNA von 1590 *MLL*-assoziierten Leukämiepatienten wurden vom DCAL die häufigsten Translokationspartnergene des *MLL* identifiziert. Entsprechend des Krankheitsphänotyps und des Alters sind die Patientenproben klassifiziert worden. Die Diagramme zeigen die jeweiligen TPG mit ihrem prozentualen Anteil in der klassifizierten Kohorte. Der Anteil von *AF4* ist jeweils in blau gezeigt. Altersangaben: Säuglinge < 1 Jahr; Kinder 1-18 Jahre; Erwachsene >18Jahr. Übernommen von Meyer *et al.*, 2017

Betrachtet man die Gesamt-ALL-Fälle so findet sich auch hier mit 57 % *AF4* als häufigstes TPG, wohingegen bei den Gesamt-AML-Fällen *AF9* mit 30 % am häufigsten auftritt. Bei der Altersverteilung hingegen sind *AF4* mit 40 und 42 % bei Säuglingen, als auch bei Erwachsenen, gefolgt von *AF9* mit 18 und 13 % die wahrscheinlichsten TPG. Bei Kindern zwischen 1 und 18 Jahren zeigt sich ein gedrehtes Bild. Hier ist *AF9* mit 29 %, gefolgt von *AF4* mit 22 % der prominenteste Partner.

Die Heilungsraten von Leukämien im Kindesalter sind generell mit über 80 % gut. Hingegen sind alle Formen von *MLL*-r Leukämien ein Indiz für eine schlechte Prognose, weshalb diese Formen auch als Hoch-Risiko-Leukämien eingestuft werden (Mrózek *et al.*, 1997; Balgobind *et al.*, 2009). Bei Patienten mit *MLL*-r AML zeigt eine allogene HSZ-Transplantation eine bessere Überlebensrate als eine Chemotherapiekomination aus Idarubicin, Daunorubicin und Mitoxantrone (Yang *et al.*, 2016). So überlebten die transplantierten Patienten im Durchschnitt 57,4 Monate, wohingegen die chemotherapierten Patienten nur etwa 21 Monate überlebten. Bei Patienten mit *MLL* induzierter ALL hingegen

ergibt sich nach dem Hochrisikoprotokoll für Säuglinge eine Heilungsrate von nur ca. 20 % (Slany, 2005).

1.4.1 Die Wildtypproteine MLL und AF4

Das MLL Protein

Beim *mixed-lineage-leukemia* (MLL) Protein, auch bekannt als *KMT2A* (Lysin Methyltransferase 2A, früher auch *ALL1* und *HRX*), handelt es sich um eine Lysin-Methyltransferase die bis zu drei Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin auf die ϵ -Aminogruppe der Ziellysinreste, genauer auf das Lysin an 4. Stelle des Histons H3 (H3K4_{me}) überträgt (Guo & Guo, 2007). Das MLL Protein zählt damit zu den chromatinmodifizierenden Enzymen und trägt zur epigenetischen Regulation der Genexpression bei. Das Gen *MLL* besitzt 37 Exons und ist auf Chromosom 11 auf Bande 23 des langen Arms lokalisiert. Es kodiert für ein 3969 Aminosäuren langes Peptid mit einem Molekulargewicht von 431 kDa (Abb. 1.5).

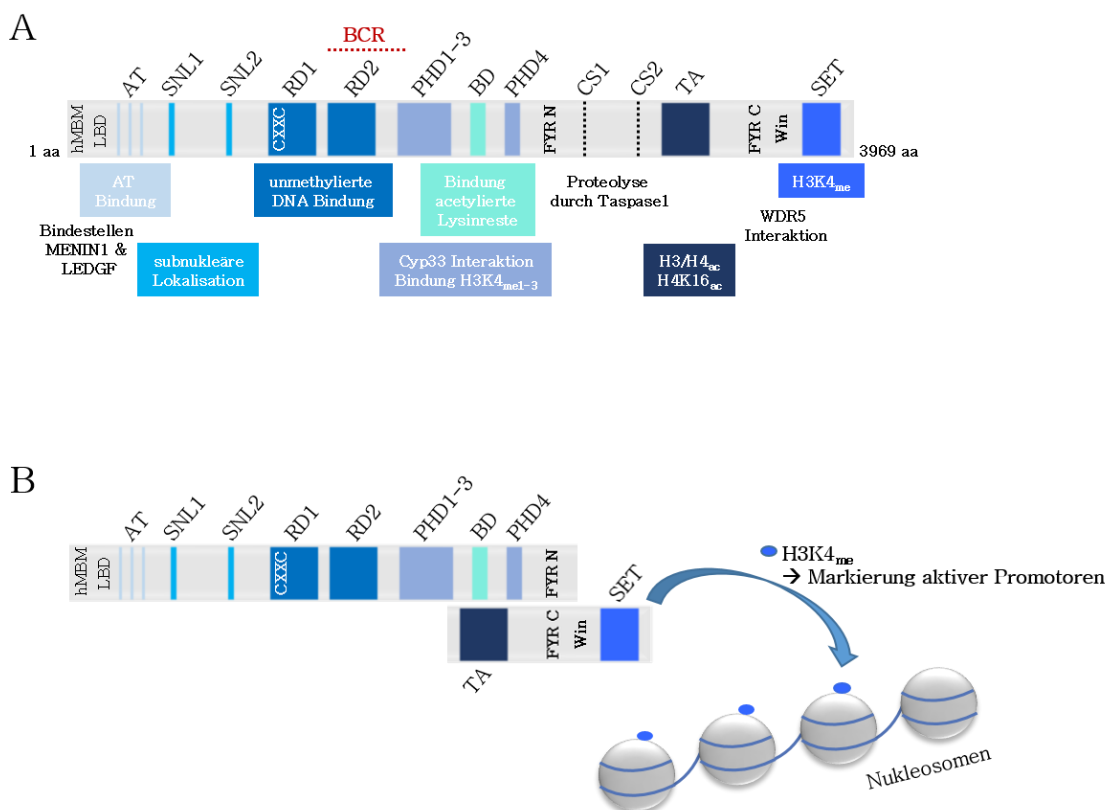


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des MLL Proteins. Domänen des unprozessierten MLL (A): hMBM (humanes MENIN1-Bindemotiv); LBD (LEDGF-Bindedomäne), AT-Haken (AT), *speckled nuclear localization side* (SNL1/2), CXXC-Domäne, Repressionsdomänen (RD1/2), Zinkfinger (PHD1-

4), Bromodomäne (BD), Taspase1-Erkennungssequenzen (CS1/2), Transaktivierungsdomäne (TA), WDR5 *interaction Motif* (Win), SET (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*)-Domäne. Die Bruchpunktsregion stellt den Bereich der am häufigsten auftretenden Doppelstrangbrüche dar (BCR). (B) Die Hydrolyse durch das Enzym Taspase1 spaltet das MLL-Protein an CS1 und CS2 in zwei funktionelle Peptide, dem 320 kDa schweren MLL^N und dem 180 kDa schweren MLL^C. Beide dimerisieren über die FYRN (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region N-terminal*) und FYRC (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region C-terminal*)-Domänen. Die SET-Domäne vermittelt die H3K4_{me}-Aktivität.

Das im Nukleus lokalisierte Protein ist ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und an den Prozessen der Embryogenese und der Hämatopoese beteiligt (Butler *et al.*, 1997; Hanson *et al.*, 1999). Das MLL Protein ist durch seine hoch konservierte, C-terminale SET (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*)-Domäne, welche die H3K4_{me}-Aktivität besitzt, homolog zum Trithorax Protein von *Drosophila melanogaster* (Gu *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992). H3K4-Methylierungen dienen der Markierung aktiver Promotoren und Gene (Schneider *et al.*, 2004; Heintzman *et al.*, 2007). Biochemische Studien haben gezeigt, dass die SET Domäne vornehmlich mono-Methylierungen vermittelt. Als Komplex mit assoziierten Faktoren wie WDR5, das über das Win-Motif ASH2L/RBBP6 Proteine rekrutiert, besitzt MLL zusätzliche Di- und auch Tri-Histon-Methylierungsaktivität (Dou *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2010). N-terminal gelegen sind die beiden Bindemotive hMBM und LBD, die bei der Regulation von Zielgenen des MLL essentielle Funktion haben. Das hMBM-Motif (*high-affinity MENIN-binding motif*) vermittelt die Bindung zum Tumorsuppressor MENIN1 (*multiple endocrine neoplasia type 1*) (Yokoyama *et al.*, 2005). Genetische Analysen an *Mll*- und *Menin*-supprimierten Mäusen ergaben, dass MLL seine Zielgenpromotoren über einen MENIN-abhängigen, oder -unabhängigen Mechanismus erkennt (Artinger & Ernst, 2013). Der MENIN-abhängige Mechanismus scheint dabei für die Aufrechterhaltung des „zellulären Gedächtnisses“ verantwortlich zu sein und kann auch von MLL-Fusionsproteinen genutzt werden. Dies wird unterstützt von MENIN-*knock down* Versuchen in HeLa Zellen bei denen sich eine reduzierte *HOXA9*-Expression zeigte (Yokoyama *et al.*, 2004). Das LBD-Motif vermittelt hingegen die Bindung zur p75-Isoform des LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*) (Yokoyama & Cleary, 2008). Des Weiteren vermittelt MENIN1 auch die Bindung von LEDGF an MLL-Fusionsproteine. Über die PWWP-Domäne von LEDGF kann der Komplex aus den drei Proteinen direkt ans Chromatin binden (Botbol *et al.*, 2008). *In vitro* wurde dazu gezeigt, dass die PXXP-Domäne von LEDGF spezifische H3K36_{me3}-Methylierungen erkennt, eine weitere Histonmodifikation die mit transkriptionell aktiven Genen einhergeht. (Eidahl *et al.*, 2013). Anschließend sind auf dem MLL Protein drei AT-Haken lokalisiert, welche die Bindung des MLL an AT-reicher DNA vermitteln (Broeker *et al.*,

1996). Daneben liegen zwei SNL-Domänen (*speckled nuclear localization site*), von denen zumindest SNL1 für die nukleäre Lokalisation des MLL Proteins verantwortlich ist (Yano *et al.*, 1997). Ebenfalls für DNA-Bindung verantwortlich ist die CXXC-Domäne, die die Bindung an unmethylierte CpG-DNA ermöglicht (Lee, Voo, & Skalnik, 2001; Allen *et al.*, 2006). Diese sind in Promotorregionen von Säugerzellen anzutreffen. Strukturelle Funktionsanalysen des Fusionsproteins MLL-ENL haben ergeben, dass die drei Domänen aus PWWP von LEDGF, CXXC von MLL und die *ANC1 homology domain* (AHD) von ENL für die leukämische Transformation *ex vivo* und *in vivo* ausreichend sind (Okuda *et al.*, 2014). Dadurch wurden die PWWP- und die CXXC Domäne als kleinstes transaktivierendes Modul (*minimal-targeting-module*, MTM) von MLL-Fusionsproteinen identifiziert. Des Weiteren gibt es vier Zinkfinger-motive, PHD (*plant homology domain*) 1-4, welche unterbrochen werden von einer Bromodomäne (BD), die zum Erkennen von acetylierten Lysinresten dienen. Durch die Bindung von Cyp33 (Cyclophilin33) am PHD Finger 3 werden im MLL Konformationsänderungen initiiert die die Bindung von HDAC1 und den PcG (*polycombgroup*)-Proteinen HPC2 und BMI-1 an die Repressionsdomänen 1 und 2 begünstigen (Fair *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). Dies führt zu einer Inhibierung der Transkription von MLL-Zielgenen, wie *HOXC8*, *HOXA9*, *CDKN1B* und *c-MYC*, und zeigt, dass MLL, in Abhängigkeit von Cyp33, sowohl aktivierende, als auch reprimierende Funktionen ausüben kann (Fair *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2014). Nach der Translation kommt es beim MLL Protein zu einer Proteolyse durch die Taspase1. Diese bindet an die Erkennungssequenzen (*cleavage sites*) CS1 (D2666) und CS2 (D2718) und spaltet das Protein in einen N-terminalen, MLL^N und einen C-terminalen Part, MLL^C. Im Anschluss kommt es zur Bildung eines Heterodimers indem sich die beiden prozessierten MLL-Polypeptide über die homologen FYRN (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region N-terminal*) und FYRC (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region C-terminal*)-Domänen aneinander anlagern (Yokoyama *et al.*, 2002; Hsieh, Cheng, & Korsmeyer, 2003). Diese Heterodimerisierung führt zu einer Stabilisierung des intramolekularen MLL Komplexes (Yokoyama *et al.*, 2013). Die im C-terminalen Part des MLL lokalisierte Transaktivierungsdomäne (TA) ist für die Rekrutierung der beiden Histonacetyltransferasen CBP (*CREB binding protein*) und MOF (*Males Absent of the First*) verantwortlich (Bannister & Kouzarides, 1996; Dou *et al.*, 2005). CBP ist in der Lage Histone, bevorzugt in Promotorregionen und MOF H4K16-Reste an aktiven Genen zu acetylieren (Martinez-Balbás *et al.*, 1998).

Durch *knock out* Studien an *D. melanogaster* und später auch an Mäusen ist bekannt, dass Mll nicht für die initiale Aktivierung, jedoch für die Aufrechterhaltung der *HOX* (Homöobox) Genexpression verantwortlich ist (Breen & Harte, 1993; Sedkov *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1995, 1998; Yagi *et al.*, 1998).

HOX Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren die auch als „Zelluläres Gedächtnis“ bezeichnet werden, da ihre positionsspezifischen Expressionsmuster während der Entwicklung aufrecht erhalten bleiben (Deschamps & van Nes, 2005; Wang, Helms, & Chang, 2009). MLL trägt dazu maßgeblich bei, indem es selbst während Mitose an seinem Zielchromatin verbleibt, um anschließend die Aufrechterhaltung spezifischer Expressionsmuster zu gewährleisten (Blobel *et al.*, 2009). Ihre Expression ist essentiell im Verlauf der Embryogenese für die Zellidentität, die axiale Skelettbildung, die Ausbildung des Metencephalons, und der Extremitäten, die Körpersegmentierung entlang der anterior-posterioren Achse und der Organentwicklung. Des Weiteren werden sie während der embryonalen und auch adulten Hämatopoese exprimiert und können auch in differenziertem Gewebe an der Regulation der Homöostase beteiligt sein (Jude *et al.*, 2007; Argiropoulos & Humphries, 2007). Bei genauerer Betrachtung der Hämatopoese werden *HOXA*-Gene unter Kontrolle von MLL in multipotenten HSZ stark exprimiert (Yagi *et al.*, 1998; Forsberg *et al.*, 2005; Jude *et al.*, 2007). Mit fortschreitender Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen sinkt die Expression der *HOXA*-Gene (Somerville & Cleary, 2006; Yokoyama *et al.*, 2013). Maus-*knock out* Studien konnten zeigen, dass MLL für die *HOXA*-abhängige Proliferation von HSZ verantwortlich ist (McMahon *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2011). Im Gegenzug jedoch obsolet, für die Homöostase von ausdifferenzierten myeloiden und lymphatischen Zellen ist (Jude *et al.*, 2007). Eine deregulierte *HOX*-Expression ist sowohl in Leukämien, als auch in soliden Tumoren, wie bspw. Prostata-tumoren zu beobachten (Abate-Shen, 2002; Shah & Sukumar, 2010; Javed & Langley, 2014). Eine erhöhte *HOXA* Expression kann, im Kontext einer Leukämie, zu einer Expansion von HSZ führen (Kroon *et al.*, 1998).

Mausembryonen mit deletiertem *Mll* (*Mll*^{-/-}) zeigten Abnormitäten in ihrem Skelettaufbau und eine deregulierte *Hox*-Expression die noch *in utero* letal war (Yu *et al.*, 1995). Die am besten untersuchten *HOXA*-Gene sind *HOXA9* und *HOXA10*. *HOXA9* ist ein wichtiger Regulator für den Prozess der Hämatopoese. Es aktiviert *Pim1*, welches die Proliferation beeinflusst und BAD-Proteine inhibiert (Hu *et al.*, 2007). Es fungiert als Onkogen und kann zur Entstehung einer Leukämie beitragen (Argiropoulos & Humphries, 2007). *HOXA10* aktiviert Gene die zur Expansion von myeloischen Vorläuferzellen führen und kann ebenfalls zur Leukämieinduktion beitragen (Shah *et al.*, 2011, 2012). Ein weiteres relevantes *HOX*-Protein ist *HOXB4*. *HOXB4* hat einen starken Einfluss auf die Expansion und Selbsterneuerung von primitiven HSZ, ohne jedoch Einfluss auf deren Differenzierung zu nehmen (Sauvageau *et al.*, 1995; Buske *et al.*, 2002). In knochenmarktransplantierten Mäusen zeigte sich bei einer retroviralen Überexpression von *HoxB4* eine 1.000-fache Anreicherung der transduzierten HSZ im Vergleich zu den mit Kontrollzellen transduzierten

Kontrollgruppe (Antonchuk, Sauvageau, & Humphries, 2002). Obwohl eine erhöhte Expression von *HOXA*-Genen als Charakteristikum für *MLL*-r ALL und AML gilt, können t(4;11)-ALL-Patienten, anhand ihrer *HOXA*-Expression, in zwei Subklassen eingruppiert werden (Trentin *et al.*, 2009). Zum einen die Gruppe mit der typischen gesteigerten *HOXA*-Signatur (*HOXA*^{high}) und eine zweite Gruppe mit reduzierter Signatur (*HOXA*^{low}). Zweitere exprimiert stattdessen den Transkriptionsfaktor *IRX1* und wird mit einer schlechteren Prognose, sowie einer höheren Rückfallquote, assoziiert (Stam *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). *IRX1* ist ein Homöoboxgen, welches während der Embryogenese für die Entwicklung des ZNS, der Extremitäten und des Herzen verantwortlich ist (Bosse *et al.*, 1997; Bruneau *et al.*, 2000). *IRX*-Gene werden normalerweise in hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert. Eine Studie unseres Arbeitskreises konnte jedoch die Interaktion zwischen *IRX1* und dem *MLL*-AF4 Komplex an Zielpromotoren nachweisen (Kühn, Löscher, & Marschalek, 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass *IRX1* in der Lage ist, die Expression von *HOXB4*, einem wichtigen hämatopoetischen Stammzellfaktor und der *EGR* Genfamilie zu induzieren. *EGR* Proteine haben ebenfalls eine wichtige Funktion in HSZ, indem sie durch die Induktion von p21 über einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase die Quieszenz einleiten und somit die Proliferation regulieren (Liu, Adamson, & Mercola, 1996; Thiel & Cibelli, 2002; Ragione *et al.*, 2003)

Als epigenetischer Regulator hält *MLL* spezifische Expressionsmuster, während der Embryogenese und der Hämatopoese, über Zellteilungen hinweg, aufrecht. Die Epigenetik ist für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen zu Geweben, Organen und ganzen Organismen essentiell.

Das AF4 Protein

Das AF4 Protein (auch AFF1) gehört, neben FMR2 (AFF2), LAF4 (AFF3) und AF5q31 (AFF4) zur ALF Familie. Bis auf FMR2, sind alle Mitglieder der ALF Familie bereits als TPG von *MLL* identifiziert worden. Das *AF4* Gen befindet sich auf Chromosom 4 und kodiert für ein 1210 AS langes Protein. Die Bruchpunktregion liegt zwischen Exon 3 und 7 (Nilson *et al.*, 1997). *AF4* wird ubiquitär exprimiert, jedoch findet sich eine erhöhte Expression in lymphatischen Zellen und der Plazenta (Frestedt *et al.*, 1996; Chao & Price, 2001). In Studien mit *Af4*^{-/-} *knock out* Mäusen zeigte sich ein schwerer Defekt in der Lymphopoese, einhergehend mit reduzierter Anzahl an B- und T-Zellen im Knochenmark, der Milz und im Thymus (Isnard *et al.*, 2000). Die myeloische Reifungslinie scheint hingegen durch *AF4* nicht beeinflusst zu werden. Die nukleäre Lokalisation, sowie DNA-Bindeeigenschaften und das Vermögen transkriptionell aktivierend zu wirken unterstützen eine mögliche Funktion als

Transkriptionsfaktor (Prasad *et al.*, 1995; Ma & Staudt, 1996; Nilson *et al.*, 1997). Des Weiteren kann durch Expression von *AF4* der HSZ- und KSZ (Krebsstammzell)-Marker CD133 exprimiert werden (Mak, Nixon, & Moffat, 2012). Gemeinsamkeiten der ALF Familie sind, zum einen die Möglichkeit auch kürzere Proteinvarianten zu produzieren und zum anderen, besitzen alle Proteine dieser Familie fünf konservierte Domänen, deren Funktionen bisher nicht restlos aufgeklärt sind (Nilson *et al.*, 1997; Bursen *et al.*, 2004) (Abb. 1.6).

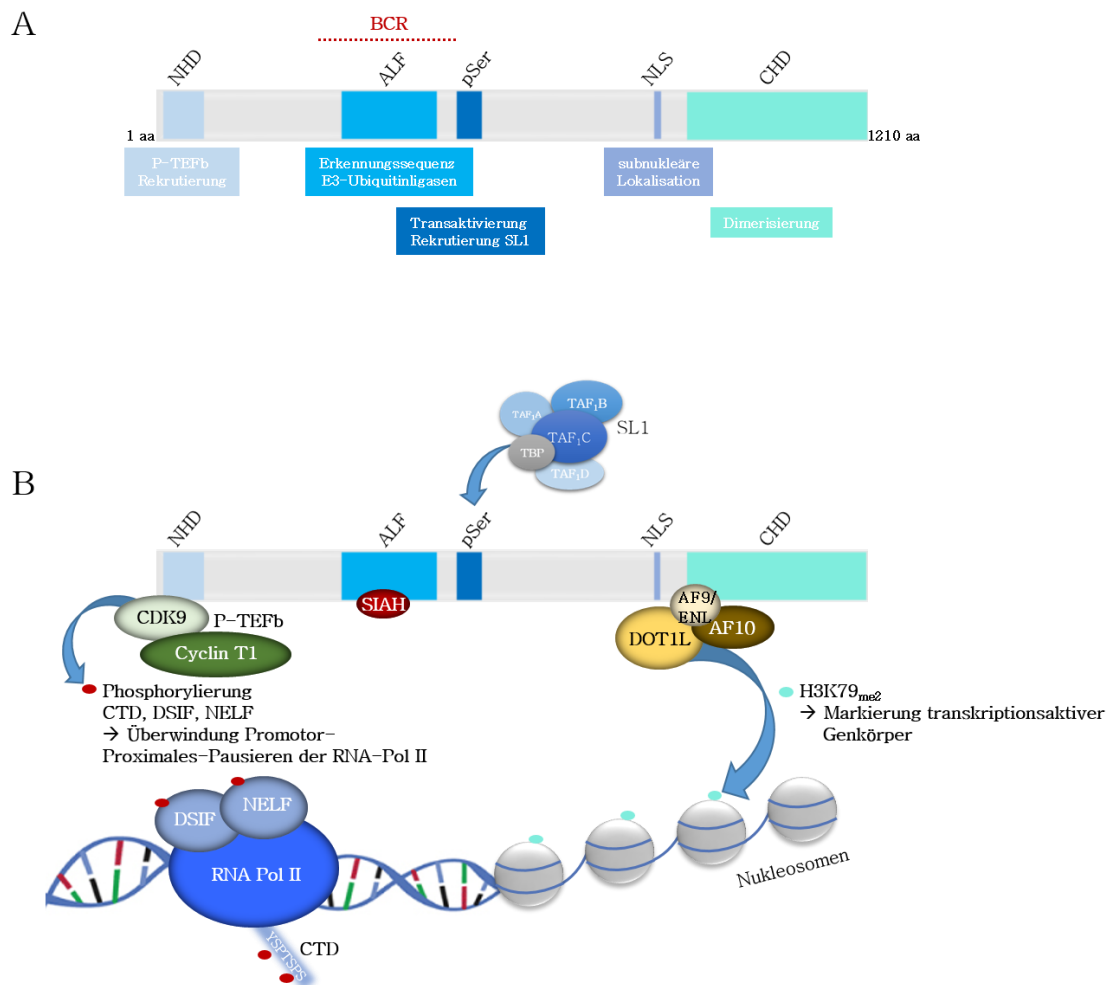


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des AF4 Proteins. (A) Domänen des AF4: NHD (*N-terminal homology domain*); ALF (AF4, LAF4 und FMR-2 Familie), pSer (*poly serine* Domäne), NLS (*nuclear localization signal*), CHD (*C-terminal homology domain*) Die Bruchpunktsregion stellt den Bereich der am häufigsten auftretenden Doppelstrangbrüche dar (BCR). (B) Beteiligung von AF4 an der Transkription durch die RNA Pol II: Überwindung des promotorproximalen Pausierens der RNA Pol II durch AF4 vermittelte Phosphorylierung der CTD (C-terminalen Domäne) der RNA Pol II, sowie DSIF und NELF durch P-TEFb (CDK9 & Cyclin T1). Markierung aktiv transkribierender Gene durch AF4, AF9/ENL & AF10 vermittelte Aktivität der Histonmethyltransferase DOT1L. Rekrutierung des SL1 Komplexes (TBP, TAF_{1A}, TAF_{1B}, TAF_{1C}, TAF_{1D}).

An beiden Enden des AF4-Proteins sind Homologiedomänen lokalisiert. N-terminal befindet sich die NHD (*N-terminal homology domain*) Domäne. Diese Domäne dient der Rekrutierung von P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*, CyclinT1 & CDK9) (Scholz *et al.*, 2015). C-terminal liegt die CHD (*C-terminal homology domain*) Domäne. Für AF5q31 konnte gezeigt werden, dass diese Domäne zur Dimerisierung mit sich selbst als Homodimer, oder mit AF4 als Heterodimer dient. Zusätzlich wurde dieser Domäne die *in vitro* Fähigkeit zur Interaktion mit Nukleinsäuren, sowie eine Substratfunktion für P-TEFb nachgewiesen (Chen & Cramer, 2019). Des Weiteren befindet sich im AF4 eine NLS (*nuclear localization signal*) Domäne, welche den Transport in den Nukleus ermöglicht. Die hochkonservierte ALF (AF4, LAF4 and FMR-2) Domäne beinhaltet eine Erkennungssequenz für die E3-Ubiquitinligasen SIAH1 und SIAH2 (Bursen *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2004). Über die SIAH-vermittelte Polyubiquitinierung des AF4 Proteins mit anschließender Degradation am Proteasom kann das Proteinlevel detailliert reguliert werden. Eine Akkumulation von AF4 führt *in vitro* zur Wachstumstransformation und *in vivo* bei Mäusen zu einer zerebralen Ataxie (*robotic mouse*) (Isaacs *et al.*, 2003; Bursen *et al.*, 2004). Diese AF4-abhängigen Einschränkungen von motorischen Fähigkeiten zeigte erstmals eine zusätzliche Rolle von AF4 im ZNS. Die serinreiche pSer (*poly serine*) Domäne besitzt transkriptionsaktivierende Eigenschaften (Prasad *et al.*, 1995; Ma & Staudt, 1996). Auf sie wird später in diesem Kapitel noch genauer eingegangen.

AF4 ist des Weiteren Teil des AEP Komplexes (AF4/ENL/pTEFb Komplex) zudem auch AF5Q31, aus der ENL (*eleven-nineteen-leukemia*) Familie und AF9, zusammen mit P-TEFb gehören (Erfurth *et al.*, 2004; Zeisig *et al.*, 2005; Bitoun, Oliver, & Davies, 2007; Mueller *et al.*, 2007). Zusammen mit Komponenten der ELL (*eleven-nineteen Lys-rich leukemia*) Familie bilden sie den sogenannten Superelongationskomplex (SEC) (Shilatifard *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2010). Dieser Komplex dient der Überwindung des *Promotor-Proximal-Pausings*, einem Transkriptions-Regulationsmechanismus in höheren Eukaryoten. Erstmals beschrieben wurde er in 1980er Jahren an Studien zu den Hitzeschockgenen von *D. melanogaster* (Gilmour & Lis, 1986; Rougvie & Lis, 1988). Dabei kommt es nach 20 bis 50 Nukleotiden hinter dem Transkriptionsstart, durch Anlagerung von DSIF (*DRB sensitive inducing factor*) und NELF (*negative elongation factor*), zum Transkriptionsstop der RNA Polymerase II (Pol II) (Bernecky, Plitzko, & Cramer, 2017; Vos *et al.*, 2018a, 2018b). Während DSIF das *5' Capping* des neu synthetisierten mRNA-Moleküls ermöglicht, blockiert NELF das katalytische Zentrum der Pol II (Pei & Shuman, 2002; Adelman & Henriques, 2018; Vos *et al.*, 2018a, 2018b). Beide Proteine stabilisieren den arretierten Zustand der Pol II (Yamaguchi *et al.*, 1999). Die

Überwindung des *Promotor-Proximal-Pausings* hin zur elongierenden Form der Pol II erfolgt mit Hilfe von P-TEFb, in Verbindung mit dem SEC-Komplex (Lin *et al.*, 2010; He *et al.*, 2010; Sobhian *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012; Li & Gilmour, 2013). Die P-TEFb vermittelte Phosphorylierung von DSIF ermöglicht die Transition von einem negativen in einen positiven Elongationsfaktor und bewirkt zusätzlich die Dissoziation von NELF (Guo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006). Die weitere Phosphorylierung der CTD (C-terminale Domäne) von Pol II führt dann zur Wiederaufnahme der Elongation (Cheng & Price, 2007). Diese Domäne besteht aus mehrere Wiederholungen (n=52) der Konsensussequenz Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇ und spielt im Verlauf der Transkription durch ihren Phosphorylierungsstatus an verschiedenen Stationen und durch die Rekrutierung unterschiedlicher Faktoren eine wichtige Rolle (Wong, Jin, & Struhl, 2014; Sato *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2017). AF4 dient innerhalb des SEC-Komplexes als positiver Regulator für die P-TEFb Kinase (Bitoun *et al.*, 2007; Benedikt *et al.*, 2011). Des Weiteren vermittelt DOT1L, als H3K79-Methyltransferase, H3K79-Histonmethylierungen entlang des Genkörpers, die die Zugänglichkeit für die Pol II während der Elongation gewährleisten.

Ein 2015 neu identifizierter Mechanismus zur Transkriptionsinitiation, unter Beteiligung von AF4 (AEP Komplex), wurde von der Forschungsgruppe von Akihiko Yokoyama von der *Kyoto University Graduate School of Medicine* aus Japan publiziert (Okuda *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Proteine der ALF Familie in der Lage sind den SL1 Komplex, eine Kernkomponente des Präinitiationskomplexes (PIC) der RNA Polymerase I (Pol I), zu rekrutieren und darüber die Transkription der Pol II zu initiieren. Dabei kommt es zur Assoziierung des SL1 Komplexes mit der pSer Domäne des ALF Proteins auf dem Chromatin. Die Bindung wird vom SDE Motif der pSer Domäne vermittelt. Dieses ähnelt der SL1-Bindestelle innerhalb des UBF Proteins, welches im Kontext der Transkriptionsinitiation durch die Pol I essentiell ist (Tuan, Zhai, & Comai, 1999). Die Funktion des zweiten Motifs innerhalb der pSer Domäne, dem NKW Motif, ist bisher ungeklärt. Zusammenfassend lässt sich somit für das AF4 Protein sowohl eine Rolle bei der Transkriptionselongation, als auch bei der Transkriptionsinitiation der Pol II festhalten.

1.4.2 t(4;11)(q21;23) Translokation

Die t(4;11) Translokation führt vornehmlich bei Kleinkindern zu einer akuten Pro-B-Leukämie mit den phänotypischen Markern CD34⁺, CD19⁺, CD10⁻. Sie wird auch als *mixed* Leukämie eingestuft da ebenfalls die myeloiden Marker CD15 und CD65 vorhanden sein können (Kalina *et al.*, 2012). Sie ist die häufigste Translokation bei ALL im Kindesalter und wurde 1979 erstmals beschrieben

(Van den Berghe *et al.*, 1979; Pui *et al.*, 2011). Ihr zu Grunde liegt die chromosomale Translokation zwischen dem *MLL* Gen auf der Bande 23 des langen Arms (q-Arm) von Chromosom 11 und dem *AF4*-Gen auf der Bande 21 des langen Arms von Chromosom 4. Es entstehen, neben den Wildtyp Genen für *MLL* und *AF4*, durch *non-homologous end joining* (NHEJ), einem Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche (Reichel *et al.*, 1998; Gillert *et al.*, 1999), die beiden Derivatchromosomen D11, mit dem Fusionsgen *MLL-*AF4** und D4 mit *AF4-*MLL** (Abb. 1.7). Die funktionalen Fusionsproteine, sind in der Lage hämatopoetische Vorläuferzellen zu leukämischen Blasten umzuprogrammieren und eine anschließende Leukämie zu induzieren (Tkachuk *et al.*, 1992; Waring & Cleary, 1997; Bardini *et al.*, 2011).

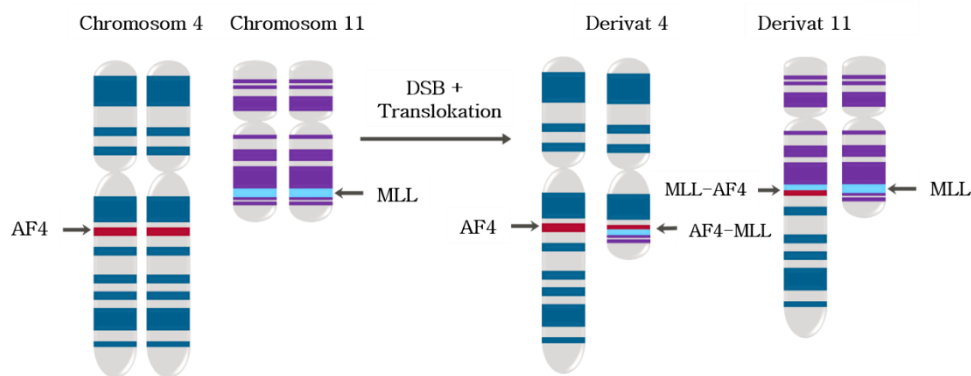
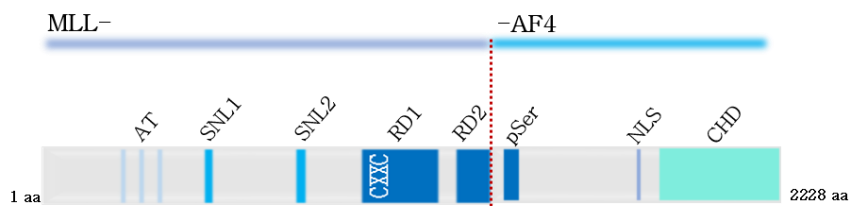


Abb. 1.7 Die t(4;11) Translokation. Schematische Darstellung der Begebenheiten einer chromosomalen t(4;11) Translokation. Beteiligte Chromosomen 4 mit dem *AF4* Gen und Chromosom 11 mit dem *MLL* Gen. Durch Doppelstrangbruch (DSB) und Translokation entstehen die Derivatchromosomen Derivat 4 mit dem Fusionsgen *AF4-*MLL** und Derivat 11 mit dem Fusionsgen *MLL-*AF4**.

In Folge der Translokation wird das Fusionsprotein *MLL-*AF4** (D11) und in 50–80 % der Fälle auch das reziproke *AF4-*MLL** (D4) produziert (Downing *et al.*, 1994; Kowarz *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2013) (Abb. 1.8). Da D11 stets exprimiert wird, gilt es als Hauptauslöser der t(4;11) Leukämie. Die Rolle von D4 ist indes umstritten und der generelle Mechanismus der zur t(4;11) Leukämie führt bisher nicht lückenlos aufgeklärt.

A Derivat 11 (D11)



B Derivat 4 (D4)

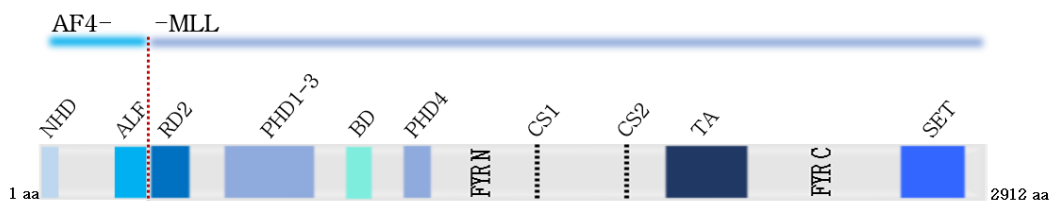


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der Fusionsproteine MLL-AF4 & AF4-MLL. Die chromosomale Translokation der t(4;11) Leukämie führt zur Generierung der Fusionsgene *MLL-AF4* (D11) & *AF4-MLL* (D4). **(A)** MLL-AF4 setzt sich aus dem N-terminalen Teil von MLL (1-1362 aa) & dem C-terminalen Teil von AF4 (347-1212 aa) zusammen. **(B)** AF4-MLL setzt sich aus dem N-terminalen Teil von AF4 (1-346 aa) & dem C-terminalen Teil von MLL (1363-3929 aa) zusammen. Die rot gestrichelte Linie kennzeichnet den Bruchpunkt.

Das MLL Protein fusioniert im Rahmen von *MLL-r*-Leukämien hauptsächlich mit Proteinen der ALF und der ENL Familie. Diese bilden zusammen mit P-TEFb den AEP Komplex (Yokoyama *et al.*, 2010). Das Fusionsprotein D11 erkennt über den N-terminalen MLL Part seine Zielgene und übt über den c-terminalen AF4 Part auf diese eine deregulierte Transkriptionsaktivierung aus. Der AF4 Part des Fusionsproteins rekrutiert den Superelongationskomplex (SEC), sowie andere epigenetische Regulatoren, was zur übermäßigen Aktivierung von MLL Zielgenen, wie beispielsweise den *HOXA* Genen führt (Faber *et al.*, 2009). D11 bildet dabei über die CHD Domäne von AF4 einen Hybridkomplex mit dem AEP Komplex. Das Resultat ist eine kontinuierliche Transkription der MLL Zielgene.

Das reziproke Fusionsprotein, das durch die t(4;11) Translokation entsteht ist D4. Es setzt sich aus dem N-terminalen Part des AF4 Proteins und dem C-terminalen Part des MLL zusammen. Seine Funktion in Bezug zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von leukämischen Blasten ist umstritten.

Eine Studie unseres Arbeitskreises konnte zeigen, dass durch retrovirale Transduktion die Expression von *D4* allein ausreichte um eine proB-ALL im Mausmodell auszulösen (Bursen *et al.*, 2010). Dem entgegen steht u.a. eine Studie in der in CD34⁺ HSZ gezeigt werden konnte, dass das reziproke Fusionsprotein D4 zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters beitragen konnte, jedoch nicht fähig war eine Leukämie zu induzieren (Prieto *et al.*, 2017). Im Jahre 2019 konnte für D11 und D4 ein kooperativer Effekt auf den Prozess der Hämatopoese belegt werden (Bueno *et al.*, 2019). Dabei konnten durch RNA- und ChIP-Sequenzierungen erhöhte H3K79_{me3} Signaturen, vor allem im Bereich der *HOXA*-Gene, identifiziert werden. Da H3K79_{me3} Methylierungen ausschließlich von der Histonmethyltransferase DOT1L vermittelt werden, deutet dies auf eine D4 abhängigen Deregulierung von DOT1L hin die zur aberranten Expression der *HOXA* Gene führt (Krivtsov *et al.*, 2008b; Deshpande *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte anhand von Untersuchungen an 42 Kleinkindern mit einer t(4;11) B-ALL eine Korrelation zwischen der Expression von D4, einer erhöhten *HOXA* Expression und einer besseren Prognose beobachtet werden (Agraz-Doblas *et al.*, 2019).

Die t(4;11)-Leukämie wird auf Grund ihrer schlechten Therapierbarkeit und einer generell allgemein schlechten Prognose als Hochrisiko-Leukämie eingestuft (Pui *et al.*, 2002, 2011; Pui & Evans, 2006). Die Therapie beruht auf Interfant-06, einem Behandlungsprotokoll das die Gabe von sogenannten Poly-Chemotherapien vorschreibt (www.kinderkebsinfo.de: Interfant-06). Voraussetzung dafür ist ein Patientenalter von <6 Monaten, eine Leukozytenanzahl von >300.000/ μ l, ein rearrangiertes *MLL*-Gen und eine ineffektive Behandlung mit Prednison. Auch die hohe Rückfallquote und damit einhergehende mögliche Therapieresistenzen sind bei diesem Leukämie-Typus kennzeichnend.

1.4.3 Die Herausforderung von t(4;11) Modellsystemen

Tierische Modellsysteme liefern ein besseres Verständnis von Krankheitsmechanismen und ermöglichen damit die Entwicklung, oder Verbesserung von Therapien. Dazu ist es nötig den Krankheitsphänotyp so exakt wie möglich im Tier rekapitulieren zu können. Im Gegensatz zu anderen Leukämien, weisen *MLL* assoziierte Leukämien, insbesondere ALL bei Kleinkindern, nur sehr wenige zusätzliche Mutationen auf (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Andersson *et al.*, 2015). Diese genetische Primitivität stellt sich zunächst als ideal für *in vivo* Studien dar. Prinzipiell lassen sich Mausmodelle mit *MLL*-FP (-Fusionsproteinen) in vier Kategorien unterscheiden.

- Virale Transduktion von Spendermauszellen
- MLL-FP Expression vom endogenen Lokus
- Virale Transduktion und/oder genetisch veränderte humane Zellen in Xenograftkombination
- Xenograft von Zelllinien aus Patientenproben, bzw. primäre Patientenzellen

Das erste Mausmodell zu MLL assoziierten Leukämien, mit Hilfe von retroviraler Transduktion, bzw. *knock in* Ansatz, entstand in den späten 1990er Jahren (Corral *et al.*, 1996; Lavau, 1997). Seither wurden generell, in Bezug auf MLL assoziierte Modellsysteme, wie beispielsweise für *Mll-Af9* und *Mll-Enl*, große Fortschritte gemacht (Barabé *et al.*, 2007; Buechele *et al.*, 2015).

Für das Fusionprotein MLL-AF4 im Speziellen stellt sich die Modellsystem-situation deutlich schwieriger dar. Oftmals entwickelt sich im Mausmodell eine AML oder ein Lymphom, anstelle einer ALL (Lavau, 1997; Chen *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008b). Dass Ergebnisse eines AML Modellsystem nicht auf ALL übertragbar sind, zeigen Unterschiede in der Sensitivität der Zielgenaktivierung und beteiligter Signalwege (Liu *et al.*, 2014). Weshalb diese Form der akuten Leukämie im Mausmodell nicht vollumfänglich rekapitulierbar ist, ist nicht umfassend geklärt und hängt wahrscheinlich von verschiedenen Faktoren ab. Mögliche Gründe sind beispielweise der Umstand, dass sich MLL-AF4 induzierte ALL, je nach Altersgruppe, deutlich voneinander unterscheiden (Sanjuan-Pla *et al.*, 2015). Des Weiteren scheint die Ursprungszelle der chromosomalen Translokation eine wichtige Rolle bei der lymphatischen, oder myeloischen Ausprägung der akuten Leukämie zu spielen (Barrett *et al.*, 2016; Stavropoulou *et al.*, 2018). Auch die Möglichkeit eines *lineage switch* von z.B. initialer B-ALL, nach einer Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Blinatumomab, zu AML im Rückfall, ist für t(4;11) Leukämien bekannt (Bardini *et al.*, 2015; Gardner *et al.*, 2016; Rayes, McMasters, & O'Brien, 2016). Viele Modellsysteme zeichnen sich außerdem durch eine, zum Teil enorm lange Latenzzeit aus (Metzler *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008b). Zudem erschweren rein technisch bei viralen Modellansätzen oftmals sehr geringe Virustiter für *MLL-AF4* die Transduktion der *MLL* Fusionsgene in den Modellorganismus (Yokoyama *et al.*, 2010; Bursen *et al.*, 2010). Dem entgegen steht eine Publikation von Lin *et al.* aus 2016. Bei diesem Modellsystem wurde anstelle eines *MLL-AF4*, ein *MLL-Af4* für die Transduktion verwendet (Lin *et al.*, 2016). Der Austausch der humanen *AF4* Sequenz gegen die murine *Af4* Sequenz resultierte in einem mehr als zehnfach erhöhtem Virustiter. Dieser speziesspezifische Effekt war exklusiv für *Af4*. Die Transduktion von MLL-Af4 transformierte murine HSZ und induzierte eine Leukämie. Während im Mausmodell wieder nur eine AML zu beobachten war, entwickelten humane CD34⁺ Zellen hingegen eine proB-ALL. Warum das artifizielle *MLL-Af4*

Konstrukt im humanen Zellsystem die t(4;11) ALL besser rekapituliert als das humane *MLL-AF4* ist bisher ungeklärt. Dies verdeutlicht, dass zur Rekapitulation des jeweiligen Leukämiephänotyps ggf. verschiedene Modellsysteme nötig sind und die jeweiligen Hürden sich sehr divers darstellen.

1.5 Der Nukleolus – Ort der Ribosomenbiogenese

Nukleoli, auch Kernkörperchen genannt, wurden erstmals in den 1960er Jahren in *Saccharomyces cerevisiae* von Miller und Beatty identifiziert (Miller & Beatty, 1969). Dabei handelt es sich um subnukleäre Kompartimente der Eukaryoten, indem die Ribosomenbiogenese (RiBi) stattfindet (Busch & Smetana, 1970; Hadjiolov, 1985). Der erste Schritt der RiBi ist die Transkription der ribosomalen RNA (rRNA) Gene durch die RNA Polymerase I (Pol I). Die rRNA Synthese nimmt bis zu 50 % der Gesamt-RNA-Produktion einer Zelle ein (Zylber & Penman, 1971; Reeder & Roeder, 1972; Warner, 1999). Neben ihr gehören auch die Synthese der 5 S rRNA durch die RNA Polymerase III, sowie die Produktion von über 70 ribosomalen Proteinen, deren Transkription die Pol II verantwortet, dazu. Die RiBi ist ein essentieller Prozess um Zellwachstum und Reaktionen auf wechselnde Einflüsse zu ermöglichen. Sie ruht nur während der Mitose und zeigt die höchste Aktivität in der S-Phase des Zellzyklus (Hernandez-Verdun, Roussel, & Gébrane-Younès, 2002; Gorski *et al.*, 2008).

1.5.1 Aufbau des Nukleolus

Der Nukleolus ist aus drei Subkompartimenten aufgebaut (Shaw & Jordan, 1995; Scheer & Hock, 1999; Raska, 2003) (Abb. 1.9). Die Fibrillaren Zentren (*fibrillar centers*, FCs) enthalten die rDNA (ribosomale DNA) Gene, jedoch nur wenig RNA (Recher, Whitescarver, & Briggs, 1969; Goessens, 1984; Koberna *et al.*, 2002). Sie werden von den Dichten Fibrillaren Kompartimente (*dense fibrillar components*, DFCs) umgeben (Junéra *et al.*, 1995). DFCs zeichnen sich durch eine hohe Konzentration an RNPs (Ribonukleoproteinen) aus und sind dadurch das dichteste Subkompartiment (Shaw & Jordan, 1995; Scheer & Hock, 1999; Raska, 2003). Das größte Subkompartiment, in dem FCs und DFs eingebettet vorliegen sind die Granulären Kompartimente (*granular components*, GCs). Sie enthalten prä-ribosomalen Partikel (Shaw & Jordan, 1995; Scheer & Hock, 1999; Raska, 2003). In welchem Subkompartiment die Transkription der rRNA Gene stattfindet ist bislang nicht völlig geklärt. *Non-isotopic* Transkriptionskartierung, zur Markierung neu synthetisierter RNA, zeigte in somatischen Säuger-, sowie Pflanzenzellen starke Signale im DFC und nur schwache Signale im FC Subkompartiment (Melcák, Risueño, & Raska, 1996; Thiry *et al.*, 2000; Cheutin *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit der einhergehenden Identifizierung von sogenannten *christmas tree* Strukturen im DFC, einer Vielzahl von

neu gebildeter rRNA entlang eines rRNA Gens in Form eines Baumes, wird das DFC als Hauptsubkompartiment, indem die rRNA Synthese stattfindet, angesehen (Miller & Beatty, 1969). Ein rRNA Gen wird gleichzeitig von etwa 100 Pol I Proteinkomplexen mit einer Geschwindigkeit von ca. 95 Nukleotiden pro Sekunde transkribiert (Birch & Zomerdijk, 2008). Anschließende frühe Prä-rRNA-Prozessierungsschritte finden ebenfalls im DFC, Spätere, sowie die Assemblierung prä-ribosomaler Partikel findet im GC statt (Lazdins, Delannoy, & Sollner-Webb, 1997; Cmarko *et al.*, 2000; Thiry *et al.*, 2000; Stanek *et al.*, 2001).

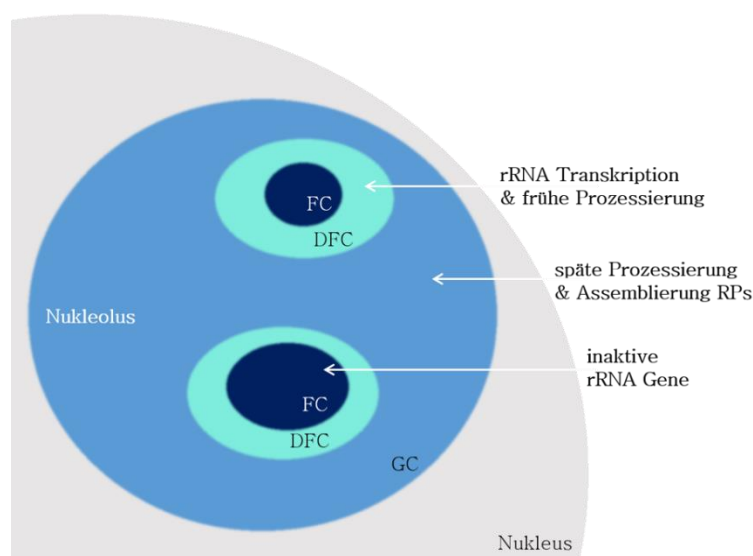


Abb. 1.9 Subkompartimentierung des Nukleolus. *Dense Fibrillar Components* (DFC), rRNA Transkription & der frühen rRNA Prozessierung; *Granular Components* (GC), späte rRNA Prozessierung & Assemblierung mit ribosomalen Proteinen (RPs); *Fibrillar Centers* (FC), inaktive rRNA Gene.

Je nach Status, kann die Morphologie der Nukleoli einer Zelle variieren. So enthalten beispielsweise ruhende Lymphozyten nur einen einzigen kleinen Nukleolus mit genau einem FC (Smetana, Lejnar, & Potměsil, 1967; Smetana, Freireich, & Busch, 1968; Raska *et al.*, 1983a). Kommt es jedoch zur Aktivierung der Lymphozyten, beispielsweise durch das Mitogen Phytohämagglutinin, ändert sich die Morphologie hin zu einem, bis mehreren, großen Nukleoli mit einer Vielzahl an FCs (Biberfeld, 1971; Raska, Rychter, & Smetana, 1983b; Ochs & Smetana, 1989). Generell lässt sich festhalten, dass Größe und Anzahl an FCs innerhalb der Nukleoli einer Zelle oftmals mit ihrer metabolischen Aktivität korrelieren (Koberna *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte an verschiedenen Kolonkrebs- und Neuroblastomzellen in Xenograftmodellen gezeigt werden, dass sich Tumorwachstum und die Größe und Anzahl von Nukleoli

entsprechen. Dadurch wurde gezeigt, dass Nukleoli von Krebszellen als diagnostische Marker für verschiedene Krebsarten dienen können (Derenzini *et al.*, 2000).

In höheren Eukaryoten, sowie in *S. cerevisiae*, liegen ribosomale Gene in hundertfacher Kopienzahl in tandemischer Wiederholung auf einem, bis mehreren Chromosomen, vor (Long & Dawid, 1980; Hadjiolov, 1985). Beim Menschen existieren in somatischen, diploiden Zellen etwa 400 solcher Kopien, in tandemischer, kanonischer (*canonical*) Anordnung auf den Chromosomen 13, 14, 15 und 22 verteilt (Abb. 1.10) (Bross & Krone, 1972). Diese Gencluster nennt man auch NORs (*Nucleolus Organizer Regions*). Sie entsprechen den FCs an kondensierten, mitotischen Chromosomen (Goessens, 1984). Jede rDNA Einheit besteht aus einer zu transkribierenden und einer externen, intergenen, nicht zu transkribierenden Sequenz (IGS; *intergenic spacer*) mit einer Gesamtlänge von ca. 43 kB (Lewis *et al.*, 1966; Liau & Perry, 1969; Sylvester *et al.*, 1986). Die rDNA Genpromotorregion enthält in Säugetieren die zwei konservierten Motive UE (*upstream element*) und CE (*core element*) (Haltiner, Smale, & Tjian, 1986; Windle & Sollner-Webb, 1986; Xie & Rothblum, 1992). Die zu transkribierende Sequenz, mit ca. 13 kb, wird von der Pol I abgelesen und das 47S prä-rRNA-Transkript von dieser gebildet (McStay & Grummt, 2008). Dieses Prä-Transkript enthält, neben den für die Assemblierung von Ribosomen notwendigen 28S, 18S und 5,8S rRNA, auch interne und externe *spacer* Sequenzen, die anschließend in komplexen Prozessierungsschritten entfernt werden.

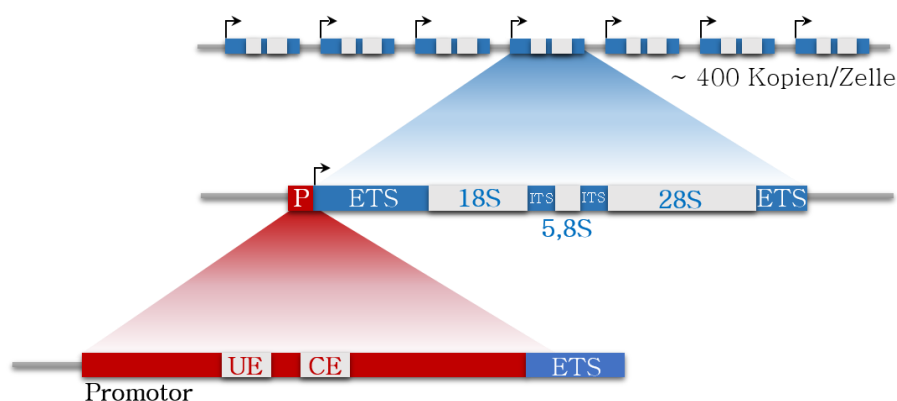


Abb. 1.10 Aufbau rRNA Geneinheiten. Humane somatische Zellen besitzen ca. 400 Kopien des rRNA Gens. Jede Geneinheit besteht aus den Sequenzen für die 18S, 5,8S & 28S rRNA. Diese liegen zwischen externen und internen Spacer Sequenzen, welche mit transkribiert und anschließend durch verschiedene *Splicevents* entfernt werden. Die Sequenz des rRNA Genpromotors enthält die zwei hoch konservierten Sequenzmotive *upstream element* und *core element*. ETS, *external transcribed spacer*; ITS, *internal transcribed spacer*; UE, *upstream element*; CE, *core element*

1.5.2 Die rRNA Transkription

Die Pol I Transkriptionsmaschinerie synthetisiert die 47S Prä-rRNA. Sie ist hoch spezie-spezifisch (Heix & Grummt, 1995). Zur Initiation der Transkription werden neben der Pol I die basalen Transkriptionsfaktoren UBF (*upstream binding factor*) und SL1 (*selectivity factor 1*, TIF-IB in Maus), sowie RRN3 (TIF-IA in Maus, Rrn3p in *S. cerevisiae*) benötigt (Learned, Cordes, & Tijan, 1985; Pikaard *et al.*, 1989; Voit *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2001). Sie bilden den Präinitiationskomplex (*pre initiation complex*, PIC) (Abb. 1.11).

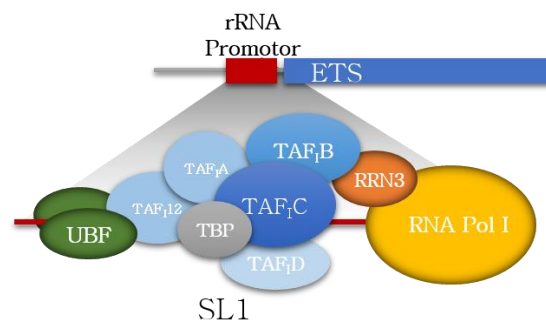


Abb. 1.11 Präinitiationskomplex der Pol I. Der Präinitiationskomplex der RNA Polymerase I am rRNA Promotor setzt sich aus dem SL1 Komplex (TBP, *TATA binding protein*; TAF_{1A}, *TBP associated factor IA*; TAF_{1B}, *TBP associated factor IB*; TAF_{1C}, *TBP associated factor IC*; TAF_{1D}, *TBP associated factor ID*), TAF₁₂, *TBP associated factor I12* UBF, *upstream binding factor* und RRN3 (auch TIFIA) zusammen.

Aktive, transkribierbare rDNA zeichnet sich durch hypomethylierte DNA, acetylierte Histonreste und die Anwesenheit von UBF aus. UBF bindet DNA als Dimer durch seine HMG (*high mobility group*) Domäne und ist in der Lage DNA-Schleifen zu erzeugen (Bazett-Jones *et al.*, 1994). Durch die Bindung von UBF wird außerdem das repressive Histon H1 verdrängt und der Euchromatinstatus der rDNA aufrechterhalten (Kermekchiev, Workman, & Pikaard, 1997). Der Ablauf der rRNA Transkription in Eukaryoten, sowie der einzelnen beteiligten Faktoren wurde erstmals in *S. cerevisiae* studiert. Da alle drei RNA Polymerasen nicht in der Lage sind ihre Zielpromotoren selbst zu erkennen und zu binden, ist die Initiierung der Transkription abhängig von einem Komplex aus TBP (*TATA box binding protein*) und jeweils verschiedenen TAFs (*TBP associated factors*). Die Pol I existiert in Säugerzellen in zwei Isoformen, Pol I α und Pol I β (Milkereit & Tschochner, 1998). Beide stellen aktive Formen der Pol I dar, jedoch ist nur Pol I β in der Lage einen funktionsfähigen PIC zu bilden. Zur Assemblierung des PICs am rDNA Promotor wird die Pol I β zunächst von RRN3 an ihrer A43 Untereinheit gebunden (Peyroche *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001). In dieser Komposition wird die Bindung an den SL1-Komplex am rDNA-Promotor ermöglicht (Moorefield, Greene, & Reeder, 2000; Bodem *et al.*, 2000;

Miller *et al.*, 2001). Der SL1 Komplex besteht aus TBP und bisher fünf identifizierten TAFs: TAF_{1A} (TAF₁₄₈), TAF_{1B} (TAF₁₆₃), TAF_{1C} (TAF₁₁₁₀), TAF_{1D} (TAF₁₄₁) und TAF₁₂ und gewährleistet die Promotorspezifität für die Pol I (Comai, Tanese, & Tjian, 1992; Comai *et al.*, 1994; Eberhard *et al.*, 1993; Zomerdijk *et al.*, 1994; Heix *et al.*, 1997; Denissov *et al.*, 2007; Gorski *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu TFIID, welches die PIC Formierung der Pol II gewährleistet, findet keine direkte Bindung zwischen TBP des SL1 Komplex und der DNA statt. Die Promotorerkennung wird stattdessen von den TAFs übernommen. SL1 erfüllt multiple Aufgaben im Zuge der PIC Assemblierung. TAF_{1C} und TAF_{1B} vermitteln die Bindung des Komplexes am Promotor, während TAF_{1A} und TBP mit UBF über dessen sauren C-Terminus interagieren und somit UBF am Promotor stabilisieren (Bell *et al.*, 1988; Jantzen *et al.*, 1992; Beckmann *et al.*, 1995; Hempel *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 2005). Alle drei TAFs sind außerdem in der Lage RRN3 zu binden und darüber die Bindung der Pol I β am Promotor zu ermöglichen (Miller *et al.*, 2001; Cavanaugh *et al.*, 2002; Gorski *et al.*, 2007). Zusammenfassend ermöglicht der SL1 Komplex Promotorspezifität durch das Erkennen und Binden des rDNA Promotors am CE, es vermittelt die Bindung der Pol I β über RRN3 an der TSS (Transkriptionsstartseite) und es stabilisiert die Bindung zwischen UBF und dem Promotor.

Nach der Bildung des PICs am rDNA Promotor muss die Pol I von den promotorgebundenen Transkriptionsfaktoren, sowie von RRN3 dissoziieren um die Transkription zu initiieren (Milkereit & Tschochner, 1998; Aprikian, Moorefield, & Reeder, 2001; Hirschler-Laszkiewicz *et al.*, 2003). Diesen Schritt nennt man *promoter escape* (Panov *et al.*, 2006). Er stellt den zeitlich limitierenden Faktor der Pol I Transkription dar (Panov, Friedrich, & Zomerdijk, 2001). Die genauen Mechanismen, die zur Dissoziation von RRN3 beitragen, sind nicht restlos geklärt. Jedoch konnte für die murine Pol I Transkription gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von zwei Serinresten an RRN3 (TIF1A in Maus) durch die Serin/Threonin Kinase CK2 (*caseine kinase 2*) die Bindung zur Pol I gelöst werden kann (Bierhoff *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass auch UBF (Hmo1 in *S. cerevisiae*) an der Dissoziation von RRN3 beteiligt ist (Schnapp *et al.*, 1994; Gadal *et al.*, 2002; Beckouet *et al.*, 2008).

Die Pol I spezifischen Transkriptionsfaktoren UBF und SL1 sind ebenfalls in die Elongation der rRNA Transkription involviert. UBF, welches nicht nur am Promotor, sondern über die gesamte Transkriptionseinheit, mit der rDNA assoziiert, reguliert die Elongation über Chromatinremodellierung (O'Sullivan, Sullivan, & McStay, 2002; Stefanovsky *et al.*, 2006). Auch für SL1 konnte gezeigt werden, dass es neben dem Promotor, weitere Bereiche der rDNA bindet und somit ebenfalls die Elongation beeinflussen könnte (Denissov *et al.*, 2011). Zusätzlich sind weitere Faktoren an der Transkriptionselongation

beteiligt. Dazu zählen weitere chromatinremodellierende Proteine wie B23/Nucleophosmin, das Histonchaperon Nucleolin und die Histonmethyltransferase G9a (Rickards *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2007; Murano *et al.*, 2008).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die t(4;11) Translokation generiert die beiden Fusionsgene *MLL-AF4* (D11) und *AF4-MLL* (D4), welche mit einer Hochrisikovariante der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) assoziiert werden. Die schlechte Prognose dieser Leukämieform resultiert daraus, dass die leukämischen Zellen ein hochaggressives Wachstum aufweisen und häufig ein Krankheitsrückfall nach erfolgter Therapie auftritt. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies liegt vor allem daran, dass es bislang kein wirklich adäquates Modellsystem gibt, welches die Krankheit vollständig rekapitulieren kann.

Lin *et al.* veröffentlichten 2016 einen neuen Ansatzes eines t(4;11) Modellsystems, indem sie das chimäre Fusionsprotein hMLL-mAf4 in HSZ und Mäusen exprimierten. Dabei zeigte sich, dass hMLL-mAf4, im Gegensatz zum vollständig humanen MLL-AF4, zumindest in humanen HSZ eine proB-ALL mit entsprechenden Krankheitsmerkmalen vollumfänglich darstellen konnte. Warum eine *MLL-Af4* Expression zu einem authentischeren Modellsystem führt als *MLL-AF4* blieb jedoch ungeklärt.

Der Prozess der Ribosomenbiogenese, allem voran, die Pol I Transkription, sind in den vergangenen Jahren verstärkt in den Fokus der Krebsforschung gerückt. Die Verbindung zwischen rDNA Transkription und Zellproliferation machen die Pol I zu einem potentiellen Ziel für neue Therapieansätze. Okuda *et al.* konnten 2015 eine Verbindung zwischen dem Pol I Transkriptionsfaktor SL1 und Komponenten des AEP Komplexes, vornehmlich der pSer Domäne von AF4 aufdecken. Dabei rekrutiert AEP SL1 zu Ziel promotoren der Pol II und ist in der Lage die Transkription dieser, mit Hilfe von SL1, zu initiieren. Diese Entdeckung beschrieb erstmals die Nutzung von Faktoren der Pol I Transkriptionsmaschinerie zur Initiierung der Pol II Transkription. Da auch für MLL-AF4 (D11) eine solche Interaktion gezeigt werden konnte, stellt sich nun die Frage, welche Rolle dieser neu entdeckte Mechanismus im Zuge der Leukämogenese einer t(4;11) Leukämie einnimmt.

Ziel dieser Arbeit ist es molekulare Mechanismen, die zur Interaktion der t(4;11) Fusionsproteine mit der Pol I Transkriptionsmaschinerie beitragen und daraus resultierende Effekte, im Kontext einer Leukämieentstehung, zu untersuchen. Zusätzlich soll dabei der Unterschied der SL1-Bindedomäne pSer zwischen AF4 und Af4 im Fokus stehen.

2 Organismen, Materialien & Methoden

2.1 Organismen

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien und Bakterienstämme beschrieben.

2.1.1 Humane Zelllinie

Als Modellsystem dienten adhärierende HEK 293T Zellen. Dabei handelt es sich um embryonale Nierenzellen (ACC 635, DSMZ), ein Derivat der Zelllinie HEK 293 (ACC 305, DSMZ) welches zusätzlich ein Plasmid mit dem Gen der temperatur-sensitiven Mutante des *SV-40 large T*-Antigens (tsA1609) trägt.

Die in dieser Arbeit aus HEK 293T generierten stabilen Zelllinien sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 2.1 Generierte stabile Zelllinien mittels *Sleeping Beauty* Transpositionssystem.

Zelllinie + Transgen	SB-Vektor
HEK 293T <i>mock</i>	pSBtet_ohneLuc_P
HEK 293T D4	pSBtet_D4_P
HEK 293T D11	pSBtet_D11_B
HEK 293T D11m	pSBtet_D11m_B
HEK 293T D4+D11	pSBtet_D4_P + pSBtet_D11_B
HEK 293T D4+D11m	pSBtet_D4_P + pSBtet_D11m_B
HEK 293T D11::mCh	pSBtet_D11::mCh_P
HEK 293T D11m::mCh	pSBtet_D11m::mCh_P
HEK 293T MTM-HA-hpSer	pSBtet_MTM-HA-hpSer_P
HEK 293T MTM-HA-mpSer	pSBtet_MTM-HA-mpSer_P

P, Puromycinresistenz; B, Blasticidin S Resistenz; mCh, mCherry (rot) fluoreszierendes Protein; D4, AF4-MLL; D11, MLL-AF4; D11m, MLL-AF4 mit muriner pSer Domäne; MTM, *minimal targeting module*, HA, HA-tag; hpSer, humane pSer Domäne; mpSer, murine pSer Domäne

2.1.2 Bakterienstämme

Bei dem für Plasmidvervielfältigung und Klonierungen verwendeten *E. coli* Stamm handelt es sich um TOP10F'. Dieser Stamm zeichnet sich durch hohe Transformationseffizienzen bei methylierter, wie unmethylierter DNA, Blau-Weiß-Selektion, fehlender Endonukleaseaktivität und einer geringen Quote an unspezifischen Rekombinationen aus.

Zusätzlich wurde der *E. coli* Stamm JM110 verwendet. Dieser ermöglicht die Entfernung von bakteriell bedingten DNA-Methylierungen. Alle Vektoren die

zur Transfektion von humanen Zellen eingesetzt wurden, wurden zuvor aus JM110 aufgereinigt.

Tab. 2.2 Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
TOP10F [']	F ['] {lacIqTn10(TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen
JM110	rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F traD36 proAB lacIqZΔM15]	Agilent Technologies

2.2 Materialien

2.2.1 Vektoren

Im Folgenden werden die verwendeten Vektoren entsprechend ihres Verwendungszwecks beschrieben. Die zugehörigen Vektorkarten sind in Kapitel 8 aufgeführt.

2.2.1.1 Klonierungsvektor

Als Klonierungsvektor diente der pGEM-T® Vektor von Promega. Hierbei handelt es sich um einen linearisierten Vektor mit 3'-Thymidinüberhängen. Dies vereinfacht die Ligation mit PCR Produkten, welche durch bestimmte DNA-Polymerasen zusätzliche 3'-Adenosinüberhänge besitzen.

2.2.1.2 Transposasevektor

Zur Generierung einer stabilen Zelllinie wird der Vektor pcGlobin SB100_{xco} verwendet. Dieser trägt das Gen für die optimierte Variante der *Sleeping Beauty* Transposase SB100_{xco}. Der Vektor ist eine freundliche Spende von Prof. Dr. Zoltán Ivics, Paul-Ehrlich-Institut Langen.

2.2.1.3 *Sleeping Beauty*-Vektoren

Bei den pSBtet-Vektoren handelt sich um induzierbare Expressionsvektoren. Zwei *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen ermöglichen die einfache und orientierte Integration von GOI's. Die Induktion der GOI-Expression erfolgt dabei, über das *tet-on* System, durch die Zugabe von Doxycyclin. Dieses stammt ursprünglich

vom Tetracyclinresistenzoperon aus Bakterien. Darüber wird die Expression des GOI akkurat reguliert.

Alle verwendeten pSBtet-Vektoren mit entsprechenden GOI's sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 2.3 Verwendete pSBtet-Vektoren

Vektoren	Transgen	Resistenz	Farbmarker	Referenz
pSBtet_ohneLuc_P	keins	Amp ^R , Puro ^R	keiner	diese Arbeit
pSBtet_D4_P	D4 (AF4-MLL) AF4 Exon 1-3 + MLL Exon 10-36	Amp ^R , Puro ^R	keiner	diese Arbeit
pSBtet_D11_B	D11 (MLL-AF4) MLL Exon 1-8 + AF4 Exon 5-23)	Amp ^R , Blasti ^R	keiner	diese Arbeit
pSBtet_D11::mCh_P	D11 (MLL-AF4) MLL Exon 1-8 + AF4 Exon 5-23) mit c- term. mCherry	Amp ^R , Puro ^R	mCherry	diese Arbeit
pSBtet_D11m_B	D11m (MLL-AF4 mit muriner pSer Domäne) MLL Exon 1-8 + AF4 Exon 5-23)	Amp ^R , Blasti ^R	keiner	diese Arbeit
pSBtet_D11m::mCh_P	D11m (MLL-AF4 mit muriner pSer Domäne) MLL Exon 1-8 + AF4 Exon 5-23) mit c-term. mCherry	Amp ^R , Puro ^R	mCherry	diese Arbeit
pSBtet_TAF ₁ C::GFP_B	TAF ₁ C mit c-term. GFP & Strep TagII	Amp ^R , Blasti ^R	GFP	diese Arbeit
pSBtet_MTM-hpSer_P	MTM mit HA- <i>tag</i> & humaner pSer Domäne	Amp ^R , Puro ^R	keiner	diese Arbeit*
pSBtet_MTM-mpSer_P	MTM mit HA- <i>tag</i> & muriner pSer Domäne	Amp ^R , Puro ^R	keiner	diese Arbeit*
pSBtet-NLS-Flag- mpSer-Strep_GP	murine pSer Domäne mit NLS und Flag/Strep- <i>tag</i>	Amp ^R , Puro ^R	GFP	Plasmid konstruiert von Magdalena Hemberger

Amp^R, Ampicillinresistenz; Puro^R, Puromycinresistenz; Blasti^R, Blastocidin S Resistenz; mCh, mCherry (rot) fluoreszierendes Protein; GFP, grün fluoreszierendes Protein

* MTM (minimal targeting module) ist eine freundliche Spende von Prof. Dr. Akihiko Yokoyama, National Cancer Center, Tsuruoka, Japan (Okuda et al. 2015)

2.2.1.4 Luciferase-Reporter Vektoren

Die für Promotoraktivitätsstudien verwendeten Luciferase-Reportervektoren sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 2.4 Luciferase-Reporter Vektoren

Vektorbezeichnung	Beschreibung	Antibiotika-resistenz	Referenz
pRL_SV40pA	Kontrollvektor mit Renilla-Luciferase unter Kontrolle des konstitutivem <i>SV40 early</i> Promotor	Amp ^R	Addgene, 27163
pGL3_IRES_Basic	Promotorloser Reportervektor mit Firefly-Luciferase	Amp ^R	Addgene, 64784
pGL3_IRES_hPrRNA	Reportervektor mit Firefly-Luciferase unter Kontrolle des humanen rRNA-Promotors	Amp ^R	diese Arbeit

Amp^R, Ampicillinresistenz

2.2.2 Starteroligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Starteroligonukleotide wurden von der Firma Eurofins bezogen. Ihre Sequenz und die jeweilige Verwendung sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 2.5 Starteroligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck	Referenz
Der4.F	TCCGGCCCATGGATGGTCAAGATCAGGC	Expressionsnachweis	diese Arbeit
Der4.R	TTGTGGAAGGGCTCACAACAGACTTGGC	Expressionsnachweis	diese Arbeit
D11.F	ACCTACCCCATCAGCAAGAGAGGATCCTGC	Expressionsnachweis	diese Arbeit
Der11.R	GCCATGAATGGGTCATTTCTTCAGAATCT	Expressionsnachweis	diese Arbeit
D11.Pas.F	GCCCCTGGGCCTGAATCCAA	Klonierung, <i>PasI</i>	diese Arbeit
D11.Bsm.R	CGTCTCAGCATGGATGACGTTCTTGCTGA	Klonierung, <i>BsmBI</i>	diese Arbeit
Af4.pSer.F	CGTCTCCATGCTGGAGGACGACCTGCAGCTCAG	Expressionsnachweis, Klonierung, <i>BsmBI</i>	diese Arbeit
Af4.pSer.R	AGAATGCTCCTGGTCACTGCTGCCCTCAGCGAC A	Expressionsnachweis, Klonierung, <i>BsmI</i>	diese Arbeit

mCherry.f	TACTTGAAGCTGTCCTTCCC	Expressions- nachweis	diese Arbeit
mCherry.r	GGGGTACATCCGCTCGGAG	Expressions- nachweis	diese Arbeit
MTM.F	<u>GGCCTCTGAGGCC</u> ACCATGACACGCGATTCAA ACCTGGA	Expressions- nachweis, Klonierung, <i>Sfi</i> I	diese Arbeit
HA.R	GGCGTAGTCAGGCACGTCGTATGGGTA	Expressions- nachweis	diese Arbeit
GAPDH.F	GGTCACCAGGGCTGCTTTTA	Expressions- nachweis, qPCR	Spende von Dr. Alessa Kühn
GAPDH.R	CGTTCTCAGCCTTGACGGTG	Expressions- nachweis, qPCR	Spende von Dr. Alessa Kühn
pHrRNA. XhoI.f	CAC <u>CTCGAG</u> CGCGATCCTTTCTGGAGAGTCCC	Klonierung, <i>Xho</i> I	diese Arbeit
pHrRNA.r	AACGAATTCGACGAGAACGCCTGACACGCAC	Klonierung, <i>Eco</i> RI	diese Arbeit
28S.F	CGATCTATTGAAAGTCAGCCCTCGACACAAGG	qPCR	diese Arbeit
3'ETS.R	CGGTCCGGCGGGAGAGGCCGGGAGGGAGGAAGAC GAACG	qPCR	diese Arbeit
rRNA.Prom. for	GGCTGCGATGGTGGCGTTTTTGG	ChIP	diese Arbeit
rRNA.Prom. rev	GGACAGCGTGTTCAGCAATAACCCG	ChIP	diese Arbeit
HOXA9.F	CAATGCTGAGAATGAGAGCGG	qPCR	diese Arbeit
HOXA9.R	TGTATAGGGGCACCGCTTTTT	qPCR	diese Arbeit
HOXB4_RT_ for	CCTGGATGCGCAAAGTTCAC	qPCR	diese Arbeit
HOXB4_RT_ rev	CCTTCTCCAGCTCCAAGACC	qPCR	diese Arbeit

Unterstrichene Basen kennzeichnen die eingeführte Restriktionsschnittstelle. Basen in Fett kennzeichnen Basenpaarungen

2.2.3 Medien & Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien und Lösungen, sowie deren Verwendungszweck sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 2.6 Medien, Lösungen & deren Hersteller, bzw. Herstellung

Medium/Lösung	Herstellung/ Hersteller	Verwendungszweck
3 % BSA in TBS-T	3 % BSA in TBS-T (w/v) (Lagerung bei 4°C)	Proteinsyntheseassay
5 % BSA in TBS-T	5 % BSA in TBS-T (w/v) (Lagerung bei 4°C)	Western Blot

60 %ige Saccharoselösung	60 % Saccharose (w/v) in MQ-H ₂ O (Lagerung bei 4°C)	Lösung zum Auslesen der Saccharosegradienten für Polysomenprofiling
Ampicillin	Roth, in MQ-H ₂ O (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)	Antibiotikum, Selektionsmarker für <i>E. coli</i>
Anodenpuffer I	300 mM Tris 20 % Methanol (v/v) pH 10,4 (Lagerung bei RT)	Proteintransfer mit Trans-Blot® TURBO™ von BioRad (<i>semi-dry</i> Verfahren)
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20 % Methanol (v/v) pH 10,4 (Lagerung bei RT)	Proteintransfer mit Trans-Blot® TURBO™ von BioRad (<i>semi-dry</i> Verfahren)
ChIP Elutionspuffer	100 mM NaHCO ₃ 1 % SDS (w/v) (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)	ChIP
ChIP Waschpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % Triton™ X-100 (v/v) 0,1 % SDS (w/v) (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)	ChIP
DMEM, <i>low Glucose</i>	Capricorn (steril, Lagerung bei 4°C)	Nährmedium für die Zellkultur, 1 g/l Glukose
DMEM, <i>high glucose</i> , ohne Glutamin, ohne Methionin, ohne Cystein	Gibco (steril, Lagerung bei 4°C)	Nährmedium für das Proteinsyntheseassay, 4,5 g/l Glukose
DMEM, <i>high modified</i> , ohne Phenolrot, ohne Natriumpyruvat	GE <i>life sciences</i> (steril, Lagerung bei 4°C)	Nährmedium für ChIP, 4,5 g/l Glukose
Dulbecco's PBS	Capricorn (steril, Lagerung bei 4°C)	Waschpuffer für die Zellkultur
Fetales Rinderserum (FBS)	Capricorn (steril, Lagerung bei -20°C)	Zusatz für Zellkulturmedien
Fixierungslösung	3,7 % Formaldehyd (v/v) in PBS ⁺⁺ (Lagerung RT)	Zellfixierung auf Objektträgern
Instant Blue® Coomassie Färbelösung	Expedeon (Lagerung bei 4°C)	Unspezifische Proteinfärbung
Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM ε-Aminocaprinsäure 20 % Methanol (v/v) pH 9,4 (Lagerung bei RT)	Proteintransfer mit Trans-Blot® TURBO™ von BioRad (<i>semi-dry</i> Verfahren)
Kryomedium	90 % FBS (v/v) 10 % DMSO (v/v) (steril, Lagerung bei 4°C)	Kryokonservierung von humanen Zelllinien
Lämmli-Puffer (2X)	200 mM DTT 100 mM Tris-HCl pH 6,8 20 % Glycerol (v/v) 4 % SDS (w/v) 0,2 % Bromphenolblau (w/v)	Ladepuffer für SDS-PAGE

	(Lagerung bei 4°C)	
Lysispuffer	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton™ X-100 (v/v) 0,5 % NP40 (v/v) 1x PIC (frisch dazu) (Lagerung bei 4°C)	Eukaryotische Zelllyse
PBS + 100 µg/ml CHX	Dulbecco's PBS 100 µg/ml CHX (Lagerung bei 4°C)	Waschpuffer für Polysomenprofiling
PBS ⁺⁺	Dulbecco's PBS 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ (Lagerung bei 4°C)	Zellfixierung auf Objektträgern
Penicillin/ Streptomycin	Capricorn (steril, Lagerung bei 4°C)	Antibiotika, Zusatz für Zellkulturmedien
Permeabilisierungslösung	0,2 % Triton™ X-100 0,1 % SDS (w/v) in PBS ⁺⁺ (Lagerung RT)	Zellfixierung auf Objektträgern
Puromycin	PAA, in MQ-H ₂ O, (sterilfiltriert, Lagerung bei - 20°C)	Antibiotikum, Selektionsmarker für die Zellkultur
Quenchinglösung	50 mM Glycin in PBS ⁺⁺ (sterilfiltriert, Lagerung 4°C)	Zellfixierung auf Objektträgern
Ribosomenlysispuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 100 µg/ml CHX 0,5 % Triton™ X-100 (v/v) 1x PIC (frisch dazu) 40 U/ml RNasin (frisch dazu) (Lagerung bei 4°C)	Lysispuffer für Polysomenprofiling
RIPA (-SDS) Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 (v/v) 0,5 % Deoxycholat (w/v) (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)	ChIP
RLN Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8 140 mM NaCl ₂ 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 % NP-40 (v/v) (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)	Lysispuffer für RNA Isolation
Saccharosegradienten- lösung	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 100 µg/ml CHX 40 U/ml (frisch dazu) 10 bzw. 50 % Saccharose (w/v)	Lösung zur Herstellung von Saccharosegradienten für Polysomenprofiling

	(Lagerung bei 4°C)	
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 (Lagerung bei RT)	diskontinuierliche Proteingelelektrophorese
SDS-Laufpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0,1 % SDS (w/v) (Lagerung bei RT)	Laufpuffer diskontinuierliche Proteingelelektrophorese
Solution 10	Chemometec (Lagerung bei 4°C)	Zellzyklusanalyse am Nucleocounter NC-3000™
Solution 11	Chemometec (Lagerung bei 4°C)	Zellzyklusanalyse am Nucleocounter NC-3000™
Solution 13	Chemometec (Lagerung bei 4°C)	Zellzählung am Nucleocounter NC-3000™
<i>Stripping</i> Puffer	100 mM Glycin 50 mM KCl 20 mM MgCl ₂ pH 2,2 (Lagerung bei RT)	Puffer zum Lösen von Antikörpern von auf Membranen übertragenen Proteinen
TBE Puffer	100 mM Tris-HCl 50 mM H ₃ BO ₃ 2 mM EDTA (Lagerung bei RT)	Puffer für Agarosegelelektrophorese
TBS-T	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 0,1 % Tween® 20 (v/v) (Lagerung bei RT)	Waschpuffer für Western Blot
Trenngelpuffer	1 M Tris pH 8,8 (Lagerung bei RT)	diskontinuierliche Proteingelelektrophorese
YT	1,2 % Bacto™ Trypton (w/v) 0,5 % NaCl (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) (autoklaviert, Lagerung bei 4°C)	Flüssiges Komplexmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> - Stämmen
YT/YT _{amp} -Agar	YT/ YT _{amp} Medium 1 % Bacto™ Agar (w/v) (autoklaviert, Lagerung bei 4°C)	Festes Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen auf Agarplatten
YT _{amp}	YT Medium 100 µg/ml Ampicillin (autoklaviert, Lagerung bei 4°C)	Flüssiges Selektionsmedium zur Anzucht ampicillin- resistenter <i>E. coli</i> -Stämme
β-Cateninlysispuffer	1 % Triton™ X-100 (v/v) 1 % Deoxycholat (w/v) 1x PIC (frisch dazu) (Lagerung bei 4°C)	Lysispuffer für β-Cateninnachweis an eukaryotischen Zellen

amp, Ampicillin

2.2.4 Antikörper

Tab. 2.7 Antikörper & deren Hersteller

Antikörper	Hersteller	Verwendungszweck
α -Hase IgG-Peroxidase	Abcam, ab6721	Sekundärantikörper, Western Blot
α -Maus IgG-Alexa Fluor®586	Abcam, ab175473	Sekundärantikörper, Fluoreszenzmikroskopie
α -Maus IgG-Peroxidase	Abcam, ab97023	Sekundärantikörper, Western Blot
α -RNA Polymerase II	Diagenode, AC-055-100	Primärantikörper, Fluoreszenzmikroskopie
α -GFP	Abcam, ab290	CoIP; Primärantikörper, Western Blot
α -H3K4 _{me3}	Abcam, ab8580	Primärantikörper, Western Blot
α -H3K9 _{me2}	Abcam, ab1220	Primärantikörper, Western Blot
α -H3K9 _{me3}	Abcam, ab8898	Primärantikörper, Western Blot
α -H3K _{acetyl}	Millipore 06-599-MN	Primärantikörper, Western Blot
α -H3 _{total}	Abcam, ab1791	Primärantikörper, Western Blot
α -HA-Peroxidase	Sigma Aldrich, 34071100	Western Blot
α -mCherry	Abcam, ab125096	Primärantikörper, Fluoreszenzmikroskopie
α -p53	Santa Cruz, sc-47698	Primärantikörper, Western Blot
α -UBF	Santa Cruz, sc-13125	Primärantikörper, Fluoreszenzmikroskopie
α - β -Aktin-Peroxidase	Sigma Aldrich, A3854	Western Blot
α - β -Catenin	Cell Signaling, 8480	Primärantikörper, Western Blot

2.2.5 Enzyme & Kits

Tab. 2.8 Enzyme, Kits & deren Hersteller

Enzym/Kit	Hersteller & Artikelnr.	Verwendungszweck
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, G3582	Proliferationsstudien
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, G7570	ATP Gehaltsmessungen
ChIP DNA Clean & Concentrator™ Kit	Zymo Research, D5205	ChIP, DNA Aufreinigung
Clarity™ ECL Western Substrat	BioRad, 1705061	Detektion von HRP gekoppelten Antikörpern

Click-iT™ HPG Alexa Fluor™ 594 Protein Synthesis Assay Kit	Invitrogen, C10429	Proteinsyntheseassay
DNase I	Qiagen, 79254	DNA Eliminierung
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, E1910	Promotoraktivitätsstudie
EpiQuik Total Histone Extraction Kit	EpiGentek, OP-0006	Histonextraktion
Go-Taq Polymerase & Puffer	Promega, M7801	PCR
ORA® qPCR Green ROX H Mix	HighQu, QPD020	Mastermix für qPCR
PCR Aufreinigungskit	Qiagen, 28104	Aufreinigung von PCR Produkten
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, 10741395	Proteinbestimmung
Proteinase K	Roth, 7528.3	ChIP
PureYield™ Plasmid Midiprep Kit	Promega, A2492	Plasmidisolation & -aufreinigung
QIAquick® Gelextraktionskit	Qiagen, 28706X4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen
Restriktionsendonukleasen & Puffer	New England Biolabs	Spaltung von DNA
RNase A	Qiagen, 19101	ChIP
RNasin®	Promega, N2511	RNase-Inhibitor
RNeasy Mini Kit	Qiagen, 74104	RNA Isolation
Superscript® II Reverse Transcriptase & Puffer	Invitrogen, 18064022	cDNA-Synthese
T4-DNA-Ligase & Puffer	New England Biolabs, M0202	Ligation von DNA Fragmenten

2.2.6 Geräte

Tab. 2.9 Geräte & deren Hersteller

Geräte	Hersteller
ABI Prism® 310 Genetic Analyzer	Abi Prism
Analysewaage TE123S-OCE	Sartorius
Blotting-Apparatur Trans-Blot® Turbo	BioRad
CO ₂ Inkubator HERAccl 240	Thermo Scientific
Coplin Jar, Glas	VWR
Durchlichtmikroskop	Nikon
Eismaschine	Ziegra
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss
Fraktionierer	Teledyne
Geldokumentation c200	Azure Biosystems
Geldokumentation Chemi Doc™ XRS+	BioRad
Gelgießvorrichtung Easycast® B2 Owl	Thermo Scientific
Gradient Master	Biocomp
Heizblock	VWR
Magnetischer Separations-Ständer	New England Biolabs
Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Nanophotometer P330	Implen
Orbitalschüttler iQ	QInstruments

PCR Maschine	Applied Biosystems
pH-Elektrode Level 1	Inolab
Plattenlesegerät Varioskan Flash	Thermo Scientific
Research plus Mikroliterpipetten (divers)	Eppendorf AG
Rollmischer SRT6D	Stuart
Rotator SB3	Stuart
Schüttelinkubator CH4103	Infros
StepOnePlus™ Real-Time PCR Maschine	Applied Biosystems
Sterilbank SterilGard	The Baker Company
TAPE Station 2200	Agilent Technologies
Temperaturschrank	Heraeus
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG
Vakuumpumpe VAC-MAN®	Promega
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wasserbad SE-20C	Julabo
Wipptisch	Heidolph
Zellanalysegerät Nucleocounter NC-3000™	Chemometec
Zentrifugen (divers)	Eppendorf AG (5415D, 5425) VWR (Galaxy Mini Star) Beckmann (L-70, J6-HC, J2-HS, SW40)

2.2.7 Chemikalien

Tab. 2.10 Chemikalien & deren Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Accutase®	Capricorn
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 37,5:1	Roth
Agar	Bernd Euler Biotech.
Agarose	Invitrogen
Aktinomycin D	Sigma Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Bacto™ Trypton	Oxoid
Big Dye™ Terminator v1.1	Perkin Elmer
Blasticidin S	AppliChem
Bromphenolblau	Roth
CaCl ₂	Merck
Clarity™ ECL Western Substrat	BioRad
Cycloheximid	Merck
DAPI	Sigma Aldrich
Di(N-succinimidyl) Glutarat	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich
dNTP	Roche
Doxycyclin	Sigma Aldrich
DTT	Invitrogen
Duolink® In Situ Mounting Medium mit DAPI	Sigma Aldrich
EDTA	Roth
EGTA	Roth

Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
Formaldehyd	Sigma Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
HEPES	Capricorn
Heringssperma	Promega
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems
Isopropanol	Roth
L-Cystein	Roth
L-Glutamin	Capricorn
Metafectene Pro®	Biontex
Methanol	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Merck
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat	Merck
NP-40	AppliChem
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten „cOmplete“ (PIC)	Roche
Puromycin	PAA
Rinderserumalbumin BSA	Roth
RNA Screen Tape Analysis	Agilent Technologies
Roti®-Load 4x	Roth
SDS	Biomol
TEMED	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Triton™ X-100	Sigma Aldrich
Tween® 20	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Roth
ε-Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich

2.2.8 Verbrauchsmaterialien & Sonstiges

Tab. 2.11 Verbrauchs-, sowie sonstige Materialien & deren Hersteller

Materialien	Hersteller
1 kb Marker	New England Biolabs
100 bp Marker	New England Biolabs
6- well Platten	Corning
8-Kammerobjektträger Lab-Tek®II	Thermo Scientific
96- well Platten (divers)	BioRad (weiß, F-Boden) Greiner Bio-One (weiß, F-Glasboden; klar, F-Boden, steril)
Adhäsive Verschlussfolie	Nerbe Plus
Big Dye™ Terminator v1.1	Perkin Elmer
Color Protein Standard (# P7712)	New England Biolabs

Cryo-S Gefäße	Greiner Bio-One
Deckglässchen	VWR
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems
Klarlack	Essie
Magnetische Protein A <i>beads</i>	New England Biolabs
Magnetische Protein G <i>beads</i>	New England Biolabs
Metafectene Pro®	Biontex
Nitril Handschuhe S	VWR
Petrischalen	Greiner Bio-One
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
PVDF Membran Optiblot	Abcam
Reaktionsgefäße (divers)	Greiner Bio-One (50 ml, 15 ml, 5 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml)
Reaktionsgefäße, <i>low binding</i>	Biozym Scientific
RNA Screen Tape Analysis	Agilent Technologies
Roti®-Load 4x	Roth
Sterile Einmalpipetten (divers)	Greiner Bio-One (25 ml, 10 ml, 5 ml)
Sterile Pipettenspitzen (divers)	Greiner Bio-One, Thermo Scientific (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)
Sterilfilter	Sarstedt
Zellkulturschalen (divers)	Greiner Bio-One (15 cm, 10 cm)
Zellzählkammer	Chemometec (A2, A8)

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung & Passagierung

Alle Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurden stets unter einer Sterilbank durchgeführt um Kontaminationen der humanen Zellen mit Keimen zu verhindern. Die reguläre Kultivierung von HEK 293T Zellen erfolgte in Zellkulturschalen in einem CO₂-Inkubator mit 5 % CO₂-Gehalt, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und bei 37°C. Beim Zellkulturmedium handelte es sich um DMEM, *low Glucose* Medium welches mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin und 100 U Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde. Dieses wurde vor der Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Passagierung der Zellen, um eine Konfluenz von ca. 80 % nicht zu überschreiten, fand alle 2 bis 3 Tage statt. Dazu wurde das Medium mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt, die Zellkulturschale anschließend mit 1/2 Volumen PBS gespült und dann mit 1/10 Volumen Accutase® für 3 bis 5 Minuten, zur Ablösung der adhärenen Zellen, im CO₂ Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit Hilfe der 1000 µl-Pipette vereinzelt und ein

Aliquot, entsprechend einer Konfluenz von ca. 30 %, auf eine neue Zellkulturschale übertragen. Diese wurde mit frischem Medium aufgefüllt und erneut im CO₂ Inkubator inkubiert. Das im Medium enthaltene FBS inhibiert dabei die Aktivität der Accutase®, sodass die Zellen erneut adhäreren konnten.

2.3.2 Zellzahlbestimmung & Viabilitätsmessung

Zur Bestimmung von Zellzahl und Viabilität wurden die HEK 293T Zellen, wie unter 2.3.1 beschrieben, mit Hilfe von Accutase® von der Zellkulturschale abgelöst und mit der 1000 µl-Pipette sorgfältig vereinzelt. Ein 2,5 µl Aliquot der Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegten 42,5 µl Solution 13 + DAPI pipettiert. Nach mehrmaligem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurden 30 µl auf ein A2 NC-Slide™ geladen und Zellzahl, sowie Viabilität mittels bildgebender Zytometrie am Nucleocounter NC-3000™ (Chemometec), unter Nutzung des Programms „*Viability and Cell Count using NC-Slides™ – Mammalian Cells*“, bestimmt. Zur Bestimmung beider Parameter dienten die beiden fluoreszierenden Farbstoffe Acridin Orange, welches Zellen in ihrer Gänze färbt und DAPI, zur Färbung von Nuklei (DNA).

2.3.3 Transfektion

Bei dem Begriff Transfektion handelt es sich um das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Diese kann entweder stabil, mittels dem *Sleeping Beauty* Transpositionssystem, oder transient erfolgen. Dabei liefert die stabile Transfektion nach der Selektion eine Zelllinie die die Fremd-DNA dauerhaft im Genom integriert trägt. Bei der transienten Transfektion hingegen verbleibt die Fremd-DNA nur vorübergehend in der Zelle, da sie nicht repliziert wird und sich somit im Laufe der Zellteilungen aus der Zellpopulation verliert.

2.3.3.1 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird das *Sleeping Beauty* Transpositionssystem angewandt.

Das zu transfizierende, transgentragende *Sleeping Beauty* Plasmid (pSB-Plasmid) wird zusammen mit einem weiteren Plasmid, welches die Sequenz für die *Sleeping Beauty* Transposase (pcGlobin SB100_{xco}) enthält, transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente das polykationische Metafectene Pro®.

Pro Transfektion wurden HEK 293T Zellen bis zu einer Konfluenz zwischen 70 und 80 % in einem *well* einer 6-*well*-Platte mit 2 ml DMEM, *low Glucose* Medium kultiviert. Der Transfektionsansatz A setzte sich aus 2 µg DNA (1,99 µg pSB-Plasmid + 0,01 µg pcGlobin SB100_{xco}) in 100 µl PBS zusammen.

Transfektionsansatz B bestand pro Transfektion aus 6 μ Metafectene Pro® in 100 μ l PBS. Zur Fertigung des Transfektionsgemisches wurde Ansatz A in Ansatz B pipettiert und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend konnten die je 200 μ l Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und diese bei 37°C im CO₂-Inkubator für 24 h inkubiert werden.

Die im *Sleeping Beauty* Plasmid enthaltene Transpositionskassette wird von zwei Erkennungssequenzen (ITR; *inverted terminal repeat*) flankiert. Die SB100_{xco}-Transposase, welche sich auf dem zweiten Vektor (pcGlobin SB100_{xco}) unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors des humanen Cytomegalovirus (CMV) befindet, kann die Transpositionskassette über diese Erkennungssequenzen mittels eines *cut and paste* Mechanismus vom pSB-Plasmid ausschneiden und diese willkürlich an TA-Dinukleotiden ins Genom der transfizierten Zelle integrieren (Abb. 2.1). Die Transpositionskassette enthält das GOI unter der Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren TCE-Promotors (*tetracycline response element and minimal CMV-promoter enhanced*) und wird durch eine anschließende SV40-Poly-Adenylierungssequenz stabilisiert. Des Weiteren ist ein RPBSA-Promotor, welcher für die konstitutive Expression einer polycistronischen Sequenz aus dem Reversen Tetracyclin Trans Aktivator (rtTA) und einem Antibiotikaresistenzgen (Puromycin N-Acetyltransferase, bzw. Blastocidin S Deaminase) in der Transpositionskassette lokalisiert. Auch hier sorgt eine bGH-Poly-Adenylierungssequenz (*bovine growth hormone*) für Transkriptstabilität. Das Polypeptid wird nach der Translation an der 2A Peptidschnittstelle gespalten.

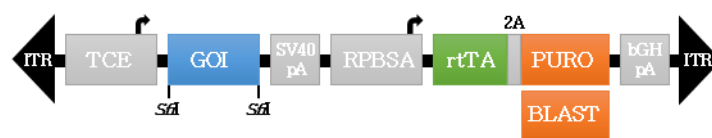


Abb. 2.1 Schema der Transpositionskassette der *Sleeping Beauty* Vektoren. ITR, *inverted tandem repeat*; TCE, *tetracycline response element and minimal CMV-promoter enhanced*; GOI, *gene of interest*; SV40pA, SV40-Poly-Adenylierungssequenz; RPBSA, synthetischer, konstitutiver Promotor; rtTA, *reverse tetracycline trans activator*; Puro, Puromycin N-Acetyltransferase; Blast, Blasticidin S Deaminase; bGHpA, Poly-Adenylierungssequenz; 2A Peptidschnittstelle, Pfeile, Transkriptionsstartseiten, SfiI, Restriktionsschnittstelle der Restriktionsendonuklease SfiI

Um sicherzustellen zu können, dass die Zellpopulation nur transfizierte Zellen mit im Genom integrierter Transpositionskassette enthält, wurde nach 24 h mit

dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker selektioniert (Puro-mycin 2 µg/ml für 24 h, Blastocidin S 15 µg/ml für 3–5 Tage). Der Selektionsprozess wurde zwei bis drei mal wiederholt.

Nach erfolgreicher Selektion kann die Expression des GOI durch Zugabe von Doxycyclin über das *tet-on* System induziert werden. Dabei bindet Doxycyclin an rtTA, welches dann durch Bindung an das *tetracycline response element* im TCE Promotor die Transkription des GOI aktiviert.

2.3.3.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion wird ohne Transposaseplasmid (pcGlobin SB100_{xco}) durchgeführt. Somit kommt es nicht zur Integration der Transpositionskassette ins Genom und folglich verringert sich die Expression des Transgenes mit der Zeit.

Je nach Experiment wurde eine definierte Anzahl HEK 293T Zellen, 24 h vor der transienten Transfektion, in entsprechenden Zellkulturschalen in DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Ansetzen und verabreichen des Transfektionsgemisches erfolgte nach den Angaben der stabilen Transfektion (2.3.3.1).

Die je nach Experiment unterschiedliche Kultivierung, Zellzahl, DNA-Konzentrationen und Volumina sind folgender Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2.12 Transfektionsparameter

Ausgebrachte Zellzahl	Größe Zellkulturschale	Medium Volumen	DNA Menge	Metafectene Volumen	PBS Volumen
2x10 ⁴	96 <i>well</i>	0,5 ml	0,1 µg	0,6 µl	15 µl
4x10 ⁵	6 <i>well</i>	2 ml	2 µg	6 µl	100 µl
1x10 ⁶	10 cm	10 ml	10 µg	42 µl	700 µl
1x10 ⁷	15 cm	15 ml	25 µg	70 µl	1500 µl

2.3.4 Proliferationsstudien

Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgte mit Hilfe des „*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*“ von Promega. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung proliferierender Zellen. Die in der Lösung enthaltene Tetrazolium-Komponente (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, MTS) und das elektronenkoppelnde Phenazin-Ethosulfat (PES) werden von lebenden Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert. Diese Reaktion ist abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und

NADPH, welche von Dehydrogenaseenzymen im Metabolismus der Zellen produziert werden.

Dazu wurden pro *well* einer 96-*well* Platte in Triplikaten je 2×10^4 Zellen in 100 μl DMEM, *low Glucose* Medium mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin ausgebracht und bei 37°C in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Nach 48 h wurden in jedes *well* 20 μl der *CellTiter 96® Aqueous One* Lösung zu pipettiert und die 96-*well* Platte für weitere 1,5 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde die 96-*well*-Platte im Varioskan Flash Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 490 nm ausgelesen. Die Intensität der Färbung ist dabei proportional zur Menge an NADH und NADPH in den Zellen.

2.3.5 ATP-Messung

Die Bestimmung des ATP Gehalts einer Zellpopulation erfolgte mit dem „*CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*“ von Promega. Dabei handelt es sich um eine lumometrische Methode bei der das Luciferase Substrat „*Beetle Luciferin*“ in Abhängigkeit von ATP und Sauerstoff durch die „*Ultra-Glo™ Recombinant*“ Luciferase unter anderem zu Oxyluciferin und Licht reagiert. Das dabei freigesetzte Licht korreliert mit der Menge an ATP in den Zellen.

Für die ATP Messung wurden pro *well* einer 96-*well* Platte in Triplikaten je 2×10^4 Zellen in 100 μl DMEM, *low Glucose* Medium mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin ausgebracht und bei 37°C in einem CO₂-Inkubator für 48 h kultiviert. Das „*CellTiter Reagenz*“ wurde nach Herstellerangaben hergestellt und davon 100 μl zu jedem *well* zugegeben. Die Zellyse erfolgte für 2 min auf einem Orbitalschüttler, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei RT. Die Lumineszenz wurde anschließend im Varioskan Flash Plattenlesegerät gemessen.

2.3.6 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse der Zellzyklusphasen wurde am Nucleocounter NC-3000™ das Programm „*Two-step cell cycle analysis*“ verwendet. Dabei handelt es sich um eine fluorometrische Methode, bei der die einzelnen Phasen des Zellzyklus über die Menge an DNA gebundenem DAPI quantifiziert werden können.

Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen durch Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 48 h induziert. Anschließend wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und 660 μl Solution 10 + 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI zu den Zellen zugegeben. Es folgte ein 10 minütige Inkubation im CO₂-Inkubator, in der die Zellen

lysierten. Mögliche Zellfragmente wurden im Anschluss mit der 1000 μl -Pipette mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst. Zur Neutralisation wurden 660 μl Solution 11 zugegeben und die Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 30 μl auf ein A2 NC-Slide™ pipettiert und dieses im Nucleo-counter NC-3000™ vermessen. Anhand der *mock* Zelllinie wurden dann die *gates* für die einzelnen Zellzyklusphasen festgelegt und diese als Matrize für alle anderen Zelllinien übernommen.

2.3.7 Promotoraktivitätsstudien

Zur Untersuchung der Aktivität des ribosomalen RNA-Promotors wurde das „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ von Promega verwendet. Dabei werden Zellen transient mit zwei Luciferase-Reportervektoren transfiziert und anschließend nacheinander die Aktivität der einzelnen Luciferasen gemessen. Der Vektor pGL3-IRES-hprRNA trägt das Firefly-Luciferasegen unter der Kontrolle des rRNA-Promotors. Von diesem Vektor wurde zusätzlich eine promotorlose Variante als Basalkontrolle verwendet (pGL3-Basic-IRES). Der zweite, co- zu transfizierende Reportervektor pRL-SV40pA diene als interner Standard. Er enthält das Renilla-Luciferasegen unter Kontrolle des konstitutiven *early SV40*-Promotors. Er diene der Normalisierung der Firefly-Luciferase Aktivität, welche proportional zur Aktivität des rRNA Promotors ist.

2.3.7.1 Transfektion der Reporterplasmide

Pro zu messender HEK 293T Zelllinie wurden 4×10^5 Zellen in je drei *wells* einer 6-*well*-Zellkulturplatte mit je 2 ml DMEM, *low Glucose* Medium mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin ausgebracht. Nach 24-stündiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurden die Zellen transient mit 2 μg der Reportervektoren wie in folgender Tabelle angegeben, mit Metafectene Pro® transfiziert. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 h im CO₂-Inkubator kultiviert.

Tab. 2.13 Transfektionsansätze für das Luciferase-Reporter-system

Ansatz	pRLSV40pA	pGL3-IRES-rRNA	pGL3-IRES-Basic
untransfiziert	-	-	-
Kontrollvektor	4 ng	-	1,996 μg
Testvektor	4 ng	1,996 μg	-

Im Falle der zusätzlichen, transienten Transfektion des Plasmides pSBtet_TAF₁C::GFP_B wurde von diesem und den pGL3-IRES Plasmiden jeweils 0,998 μg DNA im Transfektionsansatz eingesetzt.

2.3.7.2 Messung der Luciferaseaktivität

Für die Messung der Luciferaseaktivitäten wurden die Zellen zunächst nach Herstellerangaben passiv lysiert. Jeweils 20 µl der Zellysate wurden in Triplikaten in eine weiße 96-*well* Platte mit Glasboden pipettiert. Die Messung der einzelnen Luciferaseaktivitäten erfolgte automatisiert am Varioskan Flash Plattenlesegerät. Von den im Anschluss ermittelten rRNA-Promotoraktivitäten wurden die Werte der untransfizierten Zellen von den Werten aller transfizierten Zellen subtrahiert, auf die Werte des pRL-SV40pA normiert und dann auf die Werte der jeweiligen *mock* Zelllinie bezogen.

2.3.8 Quantifizierung der Proteinbiosynthese

Zur Bestimmung der Proteinbiosyntheserate in HEK 293T Zellen wurde das „Click-*iT*TM HPG Alexa FluorTM 594 Protein Synthesis Assay“ Kit von Invitrogen verwendet. Dabei wird L-Homopropargylglycine (HPG), ein Analogon von Methionin während der Proteinbiosynthese in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Über die am HPG enthaltene Alkingruppe kann ein Alexa Fluor® 594 Azid in einer „click *it*“ Reaktion an das HPG ligieren. Die anschließend messbare Fluoreszenz korreliert mit der Menge an neu synthetisierten Proteinen.

Zur Verbesserung der Adhärenz der HEK 293T Zellen wurde zunächst eine 96-*well* Platte mit je 15 µl Poly-D-Lysin, wie in 2.7.3 beschrieben, beschichtet. Anschließend wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro *well*, in 6-fach Bestimmung in je 100 µl DMEM, *low Glucose* Medium mit 1 µg/ml Doxycyclin, ausgebracht. Nach 48 stündiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurde das Medium gegen methioninfreies DMEM, *high Glucose* Medium, supplementiert mit 10 % FBS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 200 µM L-Cystein, 10 mM HEPES und 50 µM Click-*iT*® HPG, gewechselt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen in methioninfreiem, supplementiertem Medium ohne Click-*iT*® HPG. Die Fixierung der Zellen und Detektion des HPG-abhängigen Alexa FluorTM 594 Signals am Varioskan Flash Plattenlesegerät erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die gemessenen Alexa FluorTM 594 Signale wurden im Anschluss auf die DAPI-Werte normiert und dann auf die Werte der *mock* transfizierten Zellen bezogen.

Im Falle der zusätzlichen, transienten Transfektion des Plasmides pSBtet_TAF₁C::GFP_B wurden 100 ng wie in 2.3.3.2 beschrieben 24 h vor dem Assay transient transfiziert.

2.3.9 Kryokonservierung

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden HEK 293T Zellen, mit einer Konfluenz von mindestens 70 %, wie unter 2.3.1 beschrieben, von einer 10 cm Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 2.000 rpm und RT für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kryomedium resuspendiert und die Suspension in ein Cryo-S Gefäß überführt. Die Lagerung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Standardmethoden

Die Durchführung der im Folgenden aufgelisteten molekularbiologischen Standardmethoden erfolgte gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers, bzw. der Protokollsammlung „*Molecular Cloning A Laboratory Manual*“ (Sambrook und Russell, 2001)

- Herstellung CaCl₂ kompetenter & elektrokompetenter *E. coli*
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels PureYield™ Plasmid MidiPrep System von Promega
- Minilysat Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse
- Alkoholische Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Agarosegelelektrophorese
- Gelextraktion von DNA mittels QIAquick® Gel *extraction* Kit von Qiagen
- Ligation von DNA mittels T4 DNA-Ligase
- PCR Analysen
- Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA/RNA
- Spaltung von DNA mit diversen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs)
- Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation und Hitzeschock
- Isolierung von cytoplasmatischer RNA aus Säugerzellen (RNeasy Mini-Kit von Qiagen)
- Reverse Transkription von RNA in cDNA (Invitrogen)

2.4.2 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Bestimmung der Nukleotidabfolge von DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Sanger et al., 1977). Diese kann dabei durch die Nutzung von vier unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen ermittelt werden.

Der Sequenzieransatz besteht aus 1 µg der zu sequenzierenden DNA, 2 pmol Starteroligonukleotiden, 1x „*ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*“ Lösung und MQ-H₂O ad. 10 µl.

Für die Amplifizierung wurde folgendes Programm verwendet.

Tab. 2.14 Sequenzierprogramm

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	10 sek	
Anlagerung	56°C	10 sek	X35
Elongation	60°C	4 min	

2.4.3 RNA Techniken

2.4.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA aus HEK 293T Zellen wurden 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und im CO₂-Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Vor der Isolation wurde zunächst das Medium abgezogen und die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in 1 ml kaltem PBS mechanisch durch die 1000 µl-Pipette von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen bei 2.000 rpm und 4°C für 2 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß fortan in einem Eisbad gelagert. Es folgte die Resuspendierung der Zellen in 175 µl kaltem RLN Puffer und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Während dieser wurden die Zellen lysiert. Zur Sedimentierung der Zelltrümmer wurde anschließend erneut für 2 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Gesamt-RNA mittels des „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen), einschließlich DNase I Verdau, nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl MQ-H₂O eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.3.2 Konzentrationsbestimmung & Quantifizierung von Gesamt-RNA

Die Konzentrations-, sowie die Reinheitsbestimmung von Gesamt-RNA erfolgte photometrisch am Nanophotometer P330 (Implen).

Um die Menge an Gesamt-RNA in Bezug zur, zur Isolation eingesetzten, Zellzahl bestimmen zu können, wurde vor der Isolation die Zellzahl, wie in 2.3.2

beschrieben, bestimmt und die gleiche Anzahl an Zellen pro Zelllinie zur Isolation eingesetzt.

2.4.3.3 Bestimmung des Verhältnisses von 18S zu 28S rRNA

Um das Verhältnis von 18S zu 28S rRNA bestimmen zu können wurde je 1 μl isolierter Gesamt-RNA mittels der „*RNA Screen Tape Analysis*“ an der Tape Station 2200 vermessen. Anschließend wurde die Signalstärke der 18S und 28S rRNA mit dem Programm ImageJ quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.4.4 Quantitative Real Time-PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine Methode zur Quantifizierung von spezifischen DNA-Transkripten in Echtzeit. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I wird dabei mit jedem Zyklus in die steigende Anzahl an Amplifikaten eingelagert und gemessen. Die Amplifikatmenge ist dabei proportional zur Intensität der Fluoreszenz.

Verwendet wurde das StepOne Plus-System von Applied Biosystems mit dem ORA™ RT-PCR Green ROX H Mix von HighQu. Die vergleichende $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde zur Auswertung angewandt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet und als Referenz diente die *mock* Zelllinie. Jeder qPCR-Ansatz bestand aus 0,25 μl cDNA, 5 μl RT-PCR Green ROX H Mix, je 1,25 μl Vorwärts- und Rückwärts-Starteroligonukleotid (5 pmol) und 2,25 μl MQ-H₂O.

Für die Amplifizierung wurde folgendes Programm verwendet.

Tab. 2.15 qPCR Programm

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	X1
Denaturierung	95°C	15 sek	X40
Elongation	60°C	1 min	

Für jedes verwendete Starteroligonukleotidpaar wurde zudem einmal eine Schmelzkurvenbestimmung nach dem qPCR-Lauf durchgeführt.

2.4.5 Massive Analysis of cDNA Ends (MACE)

Bei MACE (*massive analysis of cDNA ends*) handelt es sich um eine Variante der *3' single end mRNA-Seq/ Taq-Seq*-Technik (Abb. 2.2). Dabei werden mRNA Transkripte fragmentiert und durch ihre 3'-PolyA-Sequenz an Streptavidin *beads* gebunden. Jedes mRNA Transkript in einer Probe wird mit einer individuellen Barcode-Sequenz ligiert. Dies verhindert das Sequenzieren von PCR Duplikaten und führt dazu, dass ein einzelnes Transkript genau einen *read* in der anschließenden Sequenzierung ergibt. Des Weiteren ist keine anschließende Längennormierung notwendig. MACE ermöglicht es dadurch auch Transkripte von gering exprimierten Genen zu identifizieren und zu quantifizieren.

Durchgeführt wurde die MACE Analyse mit anschließender Expressionsanalyse (*differential expression analysis*) von der Firma GenXPro (Frankfurt a.M).

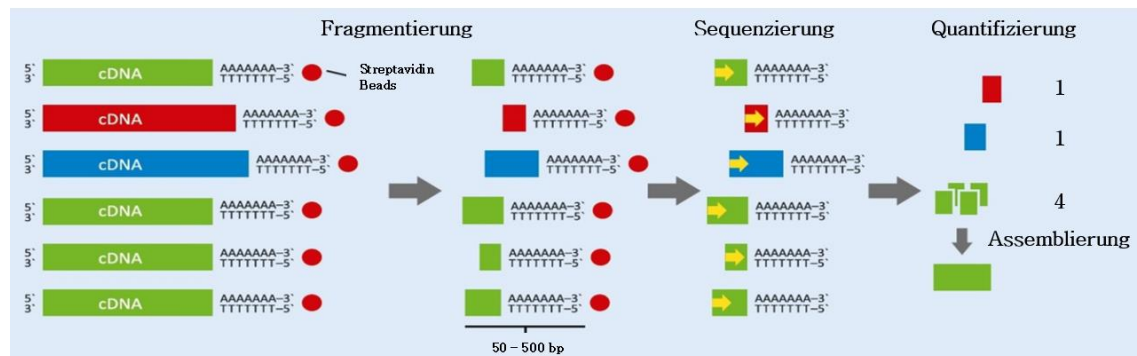


Abb. 2.2 Schema der MACE 3'RNA Sequenzierungstechnik. mRNA Moleküle werden nach der cDNA Synthese über ihre 5'Poly-A-Sequenz an Streptavidin *beads* (roter Punkt) gebunden, zu 50-500 bp langen Fragmenten fragmentiert. Jedes cDNA Molekül wird mit einer individuellen Barcode-Sequenz ligiert. Dies verhindert das Sequenzieren von PCR Duplikaten und führt dazu dass ein einzelnes Transkript genau einen *read* in der anschließenden Sequenzierung ergibt. Übernommen und modifiziert von GenXPro Homepage, Stand 02.06.2021

Bei den eingesendeten Proben handelte es sich um isolierte RNA aus HEK 293T Zelllinien in drei biologischen Replikaten, welche für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert wurden (2.4.3). Die Integrität der RNA wurde zuvor durch Bestimmung des RIN^e-Wertes mit Hilfe der „*RNA ScreenTape Analysis*“ an der Tape Station 2200 nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nur Proben mit einem RIN^e-Wert <8 wurden zu GenXPro gesandt. Die Firma präparierte MACE-Bibliotheken mit Hilfe des „*Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) Library Preparation Kit (v2.0)*“ von GenXPro. Die Synthese der cDNA wurde unter Verwendung von Oligo(dT) Starteroligonukleotiden generiert und mit ID-Oligos versehen. Anschließend konnten die Proben vereinigt und die cDNA in

200 bp Fragmente fragmentiert werden. Dies geschah an einem Biorupter Plus Sonifizierer (Diagenode). Der Erfolg der Fragmentierung wurde mit Hilfe der LabChip GXII Touch HT Platform (PerkinElmer) überprüft und die eine PolyA-Sequenz enthaltenden cDNA Fragmente über „*solid phase reversible immobilization (SPRI) beads*“ (Agencourt AMPure XP) aufgereinigt und an UMI Adaptoren (TrueQuant Adaptoren) ligiert. Nach der PCR-Amplifikation und einer erneuten Aufreinigung mit SPRI *beads* erfolgte die Sequenzierung am HiSeq2500 Sequenzierer (Illumina). Die bioinformatische Analyse erfolgte nach dem Protokoll von und durch GenXPro. Nach der Entfernung von PCR-Duplikaten und Adaptoren wurden die erhaltenen Rohsequenzen (*reads*) unter Verwendung von Bowtie 2 gegen das humane Genom (*Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13; GRCh38.p13*) *align*t. Die anschließende Analyse wurde mit Hilfe des File Maker Programms unter zu Hilfenahme von ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) für *Heatmaps* und VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR/>) für *Volcano Plots* durchgeführt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Gesamtproteinextraktion

Um aus HEK 293T Zellen Proteinextrakt zu gewinnen wurden zunächst 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und im CO₂-Inkubator kultiviert. Ggf. erfolgte nach 24 h zur Induktion der GOI-Expression die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für weitere 48 h. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgezogen und die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden 600 µl Lysispuffer auf die Zellkulturschale gegeben und diese für 30 min bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 1.000 rpm für 5 min. Das Pellet wurde verworfen und der Proteinextrakt wurde in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.1.1 Proteinlysatzgewinnung für β-Catenin Nachweis

Für den quantitativen Nachweis von β-Catenin wurden je 5×10^5 HEK 293T Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte mit 2 ml DMEM, *low Glucose* Medium und 1 µg/ml Doxycyclin ausgebracht und für 48 h im CO₂-Inkubator kultiviert. Anschließend wurden das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Zur Zellyse wurden 50 µl kalter β-Cateninlysispuffer pro *well* zugegeben und diese für 45 min bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer für 10 min bei

13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Zelllysate in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.2 Proteingehalt- & Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten (2.5.1) erfolgte mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay“ Kit von Thermo Scientific nach Herstellerangaben.

2.5.3 Histonextraktion

Zur Analyse von Histon H3 Modifikationen mussten die Kernhistonproteine (H2A/B, H3, H4) zunächst isoliert werden. Dazu wurde das „EpiQuik Total Histone Extraction Kit“ von EpiGentek verwendet.

Zunächst wurden je 1×10^6 HEK 293T Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und im CO₂-Inkubator über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Anschließend wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, mechanisch mit der 1000 µl-Pipette in 1 ml kaltem PBS von der Zellkulturschale abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der Histone erfolgte nachfolgend nach Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Histonextrakte am Nanophotometer P330 von Implen bei einer Wellenlänge von 230 nm vermessen. Eine OD₂₃₀ von 0,42 entspricht dabei einer Konzentration von 1 mg/ml.

2.5.4 Proteinauftrennung & Immunologischer Proteinnachweis

Der Western Blot dient der Detektion eines spezifischen Proteins aus einem Gesamtproteinextrakt mittels Antikörpermarkierung. Die verschiedenen Proteine des Gesamtproteinextrakts müssen dafür zuvor entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt und auf eine Membran transferiert werden.

2.5.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Protein anhand ihrer Größe wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Dabei wird der Proteinextrakt auf ein, je nach zu detektierendem Protein, 6-15 %iges SDS-Gel aufgeladen und bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel etwa 1 h aufgetrennt.

2.5.4.2 Unspezifische Anfärbung von Proteinen

Um aufgetrennte Proteine in SDS-Gelen sichtbar zu machen wurde diese für ca. 15 min in 50 ml „Instant Blue®“ Coomassie-Färbelösung von Expedeon auf einem Wippschüttler bei RT inkubiert, anschließend in ca. 50 ml Wasser gespült und dann mit der Geldokumentation Chemi Doc™ XRS+ fotografiert.

2.5.4.3 Proteintransfer und Detektion antikörpergebundener Proteine (Western Blot)

Zur Antikörperdetektion von Proteinen mussten diese im Anschluss an die SDS-PAGE vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen werden. Für zu detektierende Proteine bis ca. 130 kDa erfolgte dies über ein semi-dry Verfahren im Trans-Blot® TURBO™ von BioRad. Nach einem 1 stündigem Blocken der Membran mit 5 % BSA in TBS-T auf einem Rollmischer bei RT erfolgte die Inkubation im Primärantikörper (2.2.4) über Nacht bei 4°C, ebenfalls auf einem Rollmischer. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran anschließend für 1 h im HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion von antikörpergebundenen Proteinen erfolgte nach erneutem Waschen in TBS-T, mit Hilfe des „Clarity™ ECL Western Substrates“ von BioRad am Molecular Imager Chemi DOC™ XRS+ von BioRad.

2.5.4.1 Entfernung gebundener Antikörper (*Stripping*)

Um verschiedene Proteine auf einer Membran nacheinander detektieren zu können wurde diese nach der Detektion des ersten Proteins für zweimal 10 min in *Stripping* Puffer inkubiert. Dabei lösen sich gebundene Antikörper von den auf der Membran befindlichen Proteinen. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen, erneut in 5 % BSA in TBS-T für 1 h geblockt und anschließend mit dem zweiten Primärantikörper zur Markierung des zweiten Proteins über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Die Detektion am Folgetag erfolgte wie in 2.5.4.3 bereits beschrieben.

2.5.4.2 Quantifizierung von antikörperdetektierten Proteinen

Die Quantifizierung einzelner Proteine zwischen verschiedenen Zelllinien erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Dabei wurde die Signalstärke der im Western Blot detektierten Proteine bestimmt, auf ein Haushaltprotein wie β -Aktin normiert und auf die *mock* Zelllinie bezogen.

2.5.5 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Die Co-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Interaktionen. Dabei werden ein spezifisches Protein, sowie dessen Interaktionspartnerproteine, durch Antikörperbindung an magnetische *beads* aus einem Proteingemisch separiert und können im Anschluss im Western Blot über entsprechende Antikörper identifiziert werden.

Die Herstellung des Proteinextraktes und die Proteinbestimmung erfolgten wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Pro CoIP-Ansatz wurden je 200 µg Proteinextrakt in ein *low binding* Reaktionsgefäß überführt und mit Lysispuffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Zum Vorklären des Lysates wurden für 1 h je 5 µl magnetische Protein A und Protein G *beads* zugegeben und diese bei 4 °C auf dem Rotator SB3 inkubiert. Anschließend wurden die *beads* in einem magnetischen Rack immobilisiert und das vorgeklärte Lysat in ein neues *low binding* Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von je 2,5 µg der spezifischen Antikörper (2.2.4). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotator SB3. Am nächsten Tag wurden je 30 µl magnetische Protein A und Protein G *beads* zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C auf dem Rotator SB3 inkubiert. Danach wurden die *beads* dreimal mit je 500 µl Lysispuffer unter Zuhilfenahme des magnetischen Racks gewaschen und zur Elution der gebundenen Proteine in 30 µl Lämmli-puffer aufgenommen. Nach 5 minütiger Inkubation bei 70°C in einem Heizblock wurden die *beads* anschließend über das magnetische Rack vom Lämmli-puffer getrennt und dieser im Western Blot analysiert.

2.5.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit ChIP kann die Bindung von Proteinen an bestimmten Bereichen des Chromatins nachgewiesen werden. Dabei werden ans Chromatin gebundene Proteine fixiert und über spezifische Antikörper an magnetischen *beads* präzipitiert. Der anschließende Nachweis der gebundenen DNA Sequenz erfolgt über qPCR.

Zuerst wurden 1×10^7 HEK 293T Zellen auf einer 15 cm Zellkulturschale in 20 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und bis zum nächsten Tag im CO₂-Inkubator kultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgezogen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1 ml PBS von der Zellkulturschale mit Hilfe der 1000 µl Pipette abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellkulturschale wurde mit weiteren 5 ml PBS nachgespült um verbliebene Zellen ebenfalls abzulösen. Die Sedimentierung der Zellen erfolgte für 5 min bei 1.800 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml DMEM ohne Phenolrot (DMEM, *high*

modified) aufgenommen. Die Fixierung, bzw. Quervernetzung der chromatin-gebundenen Proteine erfolgte zunächst durch die Zugabe von 20 µl 0,5 M Di(N-succinimidyl) Glutarat unter vortexen und einer Inkubation für 45 min bei RT. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 10 ml PBS. Für die zweite Fixierung wurde das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen und mit 270 µl 37 % Formaldehyd unter vortexen versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,25 ml 1 M Glycin gestoppt.

Die Zellyse erfolgte bei 4°C oder auf Eis mit vorgekühlten Lösungen. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 1.800 rpm sedimentiert, zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und in 1 ml FA-Lysispuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte während einer 30 minütigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Invertieren der Suspension. Um die Zellyse zu ergänzen und das Chromatin zu fragmentieren folgte eine Sonifizierung à 10 Zyklen mit je 30 sek Sonifizierung und 30 sek Pause auf der Stufe *high* mit dem Bioruptor® Next Gen (Diagenode). Die Zellysate wurden dafür in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und die Prozedur dreimal wiederholt. Das Chromatin sollte dabei zu 200–500 bp langen Fragmenten gesichert werden. Anschließend wurden die Zellysate in eine *Input* Probe à 100 µl und weiteren Aliquot à 200 µl aliquotiert und bei –80°C bis zur Verwendung gelagert.

Vor der Immunopräzipitation wurde die Größe der Chromatinfragmente kontrolliert. Dazu wurde die Quervernetzung der *Input* Probe aufgehoben und die darin enthaltene DNA aufgereinigt. 50 µl der *Input* Probe wurden mit 100 µl ChIP-Elutionspuffer und 2 µl 0,5 mg/ml RNase A versetzt und für 5 min bei 37°C und 750 rpm auf dem Heizschüttler inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 20 mg/ml Proteinase K hinzugegeben und weitere 4 h bei 65°C und 500 rpm inkubiert. Danach wurde die DNA mit Hilfe des „*ChIP DNA Clean & Concentrator™ Kits*“ von Zymo Research nach Herstellerangaben gereinigt und in 30 µl eluiert. Die Größe der DNA Fragmente wurde an der Tape Station 2200 von Agilent Technologies überprüft. Dabei sollten etwa 70–80 % der DNA eine Fragmentlänge zwischen 200–500 bp aufweisen.

Für die Immunopräzipitation wurden die magnetischen *beads* zunächst vorgeklärt. Dafür wurden pro Ansatz je 10 µl magnetische Protein A oder Protein G *beads* in *low binding* 1,5 ml Reaktionsgefäßen dreimal mit je 1 ml RIPA (–SDS) Puffer gewaschen und dann in 100 µl aufgenommen. Es wurden 75 ng/µl einzelsträngiges Heringssperma und 0,1 µg/µl BSA zugegeben und für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad rotierend inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die *beads* in 40 µl RIPA (–SDS) Puffer aufgenommen. Der Immunopräzipitationsansatz wurde in folgender Reihenfolge pipettiert: Je 1 Aliquot à 200 µg Zellysat wurde auf 1 ml mit RIPA (–SDS) Puffer aufgefüllt und mit 2 µl des jeweiligen primären Antikörpers und 40 µl der

vorgeklärten *beads* versehen. Die Immunopräzipitation erfolgte rotierend über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die *beads* dreimal mit je 600 µl ChIP Waschpuffer gewaschen und das Präzipitat in 150 µl ChIP Elutionspuffer für 30 min bei 30°C und 1.250 rpm auf dem Heizschüttler von den *beads* eluiert. Die Aufhebung der Quervernetzung, sowie die Aufreinigung der DNA erfolgten wie bereits beschrieben.

Die gereinigte DNA der Immunpräzipitate und auch der *Input* Probe wurden mit Hilfe der qPCR analysiert. Dafür wurden je 1 µl der DNA mit 1x SYBR Green I Mix und je 0,3 µl 5 µM Starteroligonukleotiden versehen und mit sterilem H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die Auswertung erfolgte nach der „percent input“ Methode von *Life Technologies* (Thermo Fisher Scientific).

2.5.7 Polysomenprofilierung

Die Polysomenprofilierung ist eine Methode zur Auftrennung der Ribosomeneinheiten von Zellen. Dabei werden Zelllysate mit Hilfe der Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Da es sich bei Ribosomen um Komplexe aus Proteinen und RNA handelt, können diese im Anschluss über Messung der Absorption der RNA bei 254 nm vermessen und ribosomenhaltige Fraktionen identifiziert werden. Je nach ribosomaler Untereinheit, vollständigem Ribosom, oder Polysom, wandern diese entlang des Gradienten unterschiedlich weit (Abb. 2.3). Eine anschließende Quantifizierung ist mit Image J durchgeführt worden.

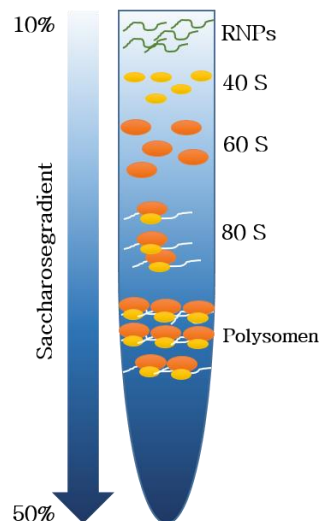


Abb. 2.3 Prinzip der Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Bei der Ribosomen- & Polysomenprofilierung werden Moleküle entsprechend ihrer Dichte innerhalb eines Saccharosegradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. RNP, ribonukleäre Proteine; 40S, kleine ribosomale Untereinheit; 60S, große ribosomale Untereinheit; 80S, Ribosom

Dazu wurden zunächst viermal 1×10^6 HEK 293T Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml DMEM, *low Glucose* Medium ausgebracht und bis zum nächsten Tag im CO₂-Inkubator kultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Vor der Ernte der Zellen wurden diese für 7 min mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert. Dadurch arretieren aktiv translatierende Ribosomen auf der mRNA. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgezogen und die Zellen mit 20 ml kaltem PBS + 100 µg/ml CHX gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml kaltem PBS + 100 µg/ml CHX mechanisch abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml kaltem PBS + 100 µg/ml CHX überführt. Die Sedimentierung der Zellen erfolgte bei RT für 3 min und 500 g. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl Ribosomenlysispuffer aufgenommen und für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Das enthaltene MgCl₂ gewährleistet die Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten als funktionales 80S Ribosom. Darauf folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C mit 15.000 g für 15 min. Der ribosomenhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die OD₂₆₀ bestimmt.

Die zur Auftrennung der Ribosomenextrakte verwendeten 10–50 % Saccharosegradienten wurden aus einer 10 %igen Gradientenlösung und einer 50 %igen Gradientenlösung mit Hilfe des Gradient Masters von Biocomp generiert. Auf diesen wurden 25 Absorptionseinheiten des Ribosomenextraktes aufgeladen und anschließend für 17 h bei 19.000 rpm in einem Beckman SW40 Rotor zentrifugiert. Das Auslesen des Gradienten erfolgte am Fraktionierer von Teledyne bei konstanten OD₂₆₀ Messung.

2.6 Sequenzvergleich der pSer Domänen von Mensch und Maus

Zum Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen der humanen pSer Domäne und der rekombinanten Variante mit einklonierter muriner Sequenz wurde das Programm Clone Manager 9 Professional Edition verwendet. Die Feststellung der Proteinhomologie erfolgte mit Hilfe der FastScan-Max Score (Cons N) Methode.

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Durchlichtmikroskopie

Zur Visualisierung optisch vergrößerter HEK 293T Zellen diente das Fluoreszenzmikroskops Observer Z1 (Carl Zeiss) unter Phasenkontrastbedingungen.

2.7.2 Fluoreszenzanregung

Die Visualisierung von Fluoreszenzsignalen in Zellen wurde am Fluoreszenzmikroskops Observer Z1 (Carl Zeiss) mit Hilfe der Software Volocity 4.2.1 (Improvision) ermöglicht. Dabei wurde unter Verwendung von geeigneten Filtern der entsprechende Fluoreszenzmarker mit seiner spezifischen Wellenlänge angeregt und die jeweilige Fluoreszenz gemessen.

Tab. 2.16 Fluorophore und ihre Anregungs- & Emissionswellenlängen

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Filter
mCherry/RFP	562 nm	641 nm	mCherry HC
DAPI/BFP	377 nm	447 nm	DAPI HC

2.7.3 Zellfixierung auf Objektträgern

Um Zellen in größeren Vergrößerungen am Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 (Carl Zeiss) betrachten zu können mussten diese zunächst auf Objektträgern aus Glas fixiert werden.

Dazu wurden zuerst die benötigten *wells* eines 8-Kammernobjektträgers Lab-Tek®II (Thermo Scientific) mit 25 µl Poly-D-Lysin beschichtet. Dies sorgte für eine bessere Adhärenz der Zellen auf der Glasoberfläche. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden jedem *well* 200 µl PBS zu pipettiert und die gesamte Lösung anschließend abgenommen. Nach 2 bis 4 h Trocknungszeit bei RT konnten 4×10^4 HEK 293T Zellen pro *well* in 0,5 ml DMEM, *low Glucose* Medium, ggf. mit 1 µg/ml Doxycyclin, ausgebracht und für 48 h in einem CO₂-Inkubator kultiviert werden.

Zur Fixierung der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 500 µl PBS⁺⁺ gewaschen. Die zweiwertigen Ionen des CaCl₂ und des MgCl₂ im PBS⁺⁺ unterstützen dabei zusätzlich die Adhärenz der Zellen auf der Glasoberfläche. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Fixierungslösung 20 min bei RT fixiert und erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen. Dann folgte eine 5 minütige Inkubation mit 100 µl Quenchinglösung um unreaktierte Aldehydgruppen zu blocken. Dieser Schritt dient der Reduktion von Hintergrundfluoreszenzen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl Permeabilisierungslösung für 15 min bei RT permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen mit 500 µl PBS⁺⁺ wurde die herausnehmbare Polystyrol-Medienkammer des 8-Kammernobjektträgers mit zu Hilfenahme des beigefügtem Werkzeuges entfernt. Zuletzt wurde auf jedes Feld des Objektträgers, das fixierte Zellen enthielt, 15 µl Duolink® In Situ Mounting

Medium mit DAPI aufpipettiert und ein Deckglässchen aufgelegt welches mit Klarlack fixiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.7.4 Fluoreszenzbasierte Antikörperdetektion an fixierten Zellen

Zur Detektion fluoreszenzmarkierter Antikörper auf fixierten Zellen wurden die auf dem Objektträger fixierten Zellen nach dem Entfernen der Polystyrol-Medienkammer des 8-Kammernobjektträgers (siehe 2.7.3) in einer Coplin Jar auf einem Wipptisch mit ca. 100 ml 5 %igem BSA in TBS-T für 1 h bei RT geblockt. Im Anschluss wurden die Ränder der Objektträgerfelder mit Zellstoffpapier getrocknet und 50 μl des jeweiligen Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung in 5%igem BSA in TBS-T auf das entsprechende Feld des Objektträgers aufpipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Objektträger dreimal mit je ca. 100 ml TBS-T in der Coplin Jar auf einem Wipptisch für je 5 min bei RT gewaschen und die Ränder der Objektträgerfelder erneut mit Zellstoffpapier getrocknet. Anschließend wurden 50 μl des jeweiligen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper auf die Objektträgerfelder aufpipettiert und für 1 h, lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurde mit Duolink® In Situ Mounting Medium mit DAPI und Deckgläschen wie in 2.7.3 beschrieben verfahren. Auch hier erfolgte die Lagerung bei -20°C .

2.7.5 Fluoreszenzbasierte Quantifizierung des UBF Proteinlevels

Zur Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden Zellen in einer 96-*well* Platte mit Glasboden wie in 2.7.3 und 2.7.4 beschrieben fixiert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte am Varioskan Flash Plattenlesegerät von Thermo. Das gemessene Fluoreszenzsignal des zu detektierenden Antikörpers wurde anschließend auf das DAPI Signal normiert.

2.8 Datenauswertung & Statistik

Sofern nicht anders beschrieben erfolgte die Datenauswertung mit Excel, bzw. Graph Pad Prism 8. Alle Graphen wurden mit Graph Pad Prism 8 und alle Abbildungen mit Power Point erstellt. Die Quantifizierung von Gelbildern und Blots erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Die Planung und Überprüfung von Klonierungen, Sequenzen, sowie von Sequenzierungen wurde mit Snap Gene durchgeführt. Sequenzalignments wurden mit Clone Manager Suite 9 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung stabiler t(4;11)-Fusionsgen exprimierender HEK 293T Zellen

Als zelluläres in vitro Modellsystem sollten HEK 293T Zellen dienen, die die t(4;11) Fusionsgene *AF4-MLL* (D4), *MLL-AF4* (D11) und *MLL-AF4m* (murine pSer Domäne, D11m), mit Hilfe des *Sleeping Beauty* (SB) Transpositionssystems, stabil exprimieren. Das D11m-Transgen musste dafür zunächst durch Klonierung generiert werden.

3.1.1 Klonierungsstrategie des chimären D11m in pSBtet_B

Da neben *MLL-AF4* (D11) und *AF4-MLL* (D4) auch der Einfluss der murinen pSer Domäne untersucht werden sollte, musste ein entsprechend chimäres D11m (D11 mit muriner pSer Domäne) kloniert werden. Das Klonierungsschema ist folgender Abbildung zu entnehmen (Abb. 3.1).

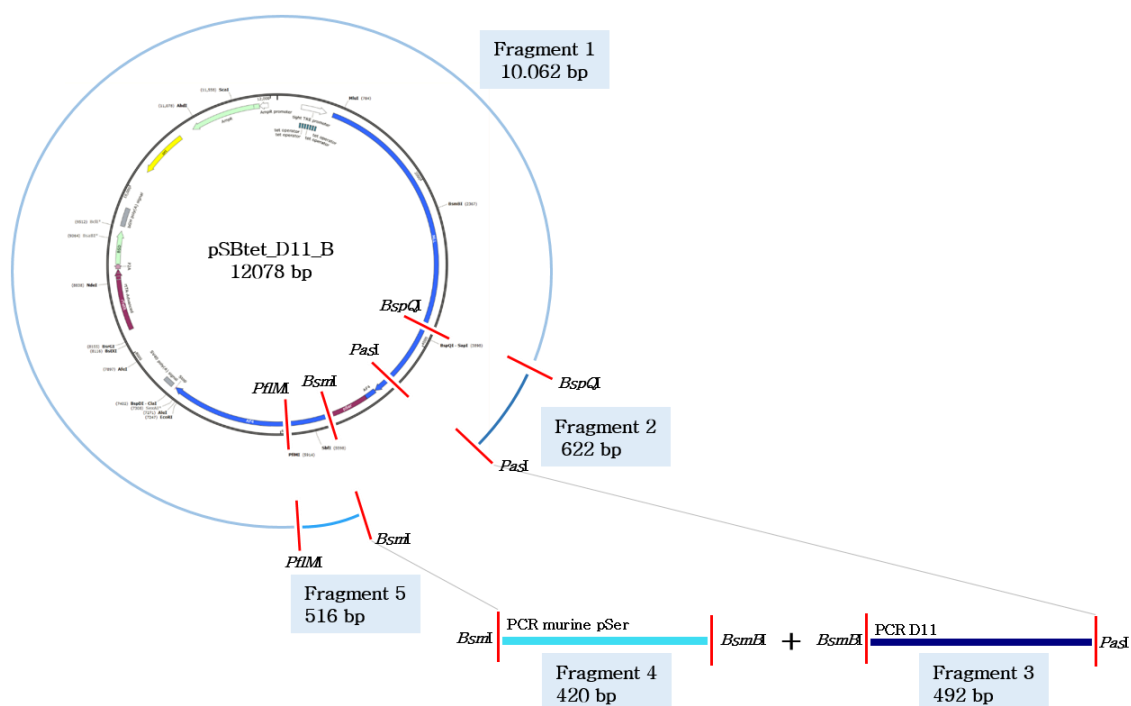


Abb. 3.1 Klonierungsschema für die Konstruktion des chimären D11m in pSBtet_B. Der Vektor pSBtet_D11_B wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BspQI*, *PstI*, *BsmI* & *PflMI* verdaut und die Fragmente 1, 2 & 5 nach der Auftrennung über Agarose-gelelektrophorese aufgereinigt. An selbigem Vektor wurde mit Hilfe der Starteroligo-

nukleotide D11.Pas.F & D11.BsmB.R das Fragment 2 in einer PCR Reaktion amplifiziert. Das Fragment 4 wurde an dem Vektor pSBtet-NLS-Flag-mpSer-Strep-GP mit Hilfe der Starteroligonukleotide Af4.pSer.F & Af4.pSer.R amplifiziert. Beide PCR Fragmente wurden anschließend aufgereinigt. Alle fünf Fragmente wurden schließlich ligiert & der *E. coli* Stamm TOP10F' mit dem Ligationsansatz transformiert.

Als Ausgangsplasmid diente pSBtet_D11_B, welches mit den Restriktionsenzymen *BspQI*, *PasI*, *BsmI* und *PfIM* verdaut wurde. Die entsprechenden Fragmente 1, 2 und 5 wurden anschließend über eine Gelextraktion aus einem 1 %igen Agarosegel in TBE extrahiert und aufgereinigt. Fragment 3 wurde mit Hilfe der Starteroligonukleotide D11.Pas.F und D11.BsmB.R an pSBtet_D11_B amplifiziert, mit *PasI* und *BsmI* verdaut und ebenfalls aufgereinigt. Fragment 4 wurde mit den Starteroligonukleotiden Af4.pSer.F und Af4.pSer.R an pSBtet-NLS-Flag-mpSer-Strep-GP amplifiziert, mit *BsmI* und *BsmI* verdaut und ebenfalls aufgereinigt. Die fünf Fragmente wurden in einer Ligationsreaktion ligiert und der *E. coli* Stamm TOP10F' damit transformiert. Die Korrektheit des neu generierten Plasmides pSBtet_D11m_B wurde mittels Restriktionsverdau und Sanger-Sequenzierung überprüft und bestätigt.

3.1.2 Sequenzvergleich zwischen D11 & dem chimären D11m

Nach erfolgreicher Klonierung des D11m in pSBtet_B sollte das neu generierte chimäre D11m mit seiner murinisierten pSer Domäne (AS 1407 – 1579) mit dem D11 mit humaner pSer Domäne (AS 1407 – 1577) verglichen werden. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen der beiden pSer Domänen gegeneinander *alignt* (Abb. 3.2).

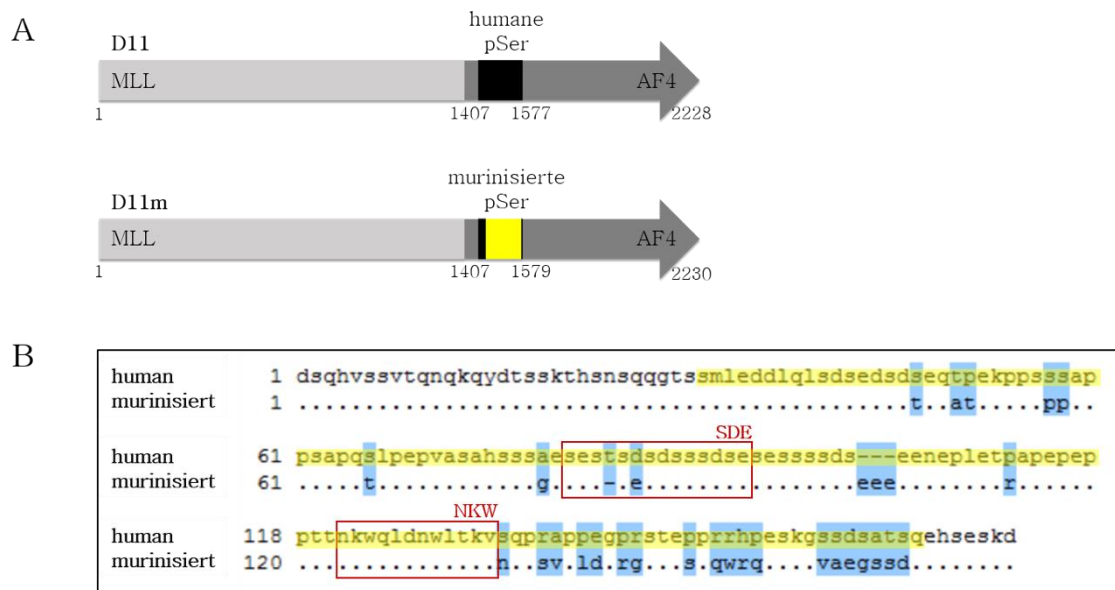


Abb. 3.2 Sequenzalignment von D11 & D11m. (A) Schematische Darstellung der Fusionsproteine D11 & D11m mit markierter humaner (schwarz), bzw. murinisierte (gelb) pSer Domäne & angegebenen Aminosäuren. (B) Aminosäuresequenzvergleich zwischen humaner & murinisierte pSer Domäne. Hellgrau, Sequenz von MLL; dunkelgrau, Sequenz von AF4; Gelb, murine Sequenz; blau, Aminosäureabweichungen; rote Box, konservierte Domänen SDE & NKW

Verglichen wurde eine Sequenz von 171 AS für die humane pSer Domäne (hpSer) mit 173 AS für die murinisierte pSer Domäne (mpSer). Der Sequenzvergleich lieferte eine Homologie von 81 %. An 27 Positionen liegt ein AS-Austausch vor. An Position 48 von hpSer und an den Positionen 102–104 kam es zu AS-Insertionen. Während das NKW Motif für beide Spezies identisch ist, findet sich im SDE Motif ein zusätzliches Threonin an Position 84 und eine Substitution von Aspartat in der humanen, zu Glutamat in der murinen pSer Domäne an Position 86.

3.1.3 Stabile Transfektion & Expressionsnachweis

Die Generierung stabiler transgenexprimierender HEK 293T Zelllinien erfolgte mit Hilfe des *Sleeping Beauty* Transpositionssystem. Dafür wurden SB-Vektoren mit unterschiedlichen Transpositionskassette, je nach gewünschtem Transgen, zusammen mit dem Vektor pcGlobin SB100_{xco}, welcher die SB-Transposase enthält, transfiziert. Die Transposase gewährleistete anschließend die Integration der Transpositionskassetten ins Genom der Zelle. Verwendet wurden SB-Vektoren mit verschiedenen Transpositionskassetten.

Generiert werden sollten zunächst sechs stabile Zelllinien. Vier davon wurden mit jeweils einem SB-Vektor transfiziert und zwei mit je zwei Vektoren co-transfiziert (Abb. 3.3A). Für die Co-Transfektionen wurde der Vektor pSBtet_D4_P zum einen mit pSBtet_D11_B und zum anderen mit pSBtet_D11m_B transfiziert. Durch die Verwendung zwei verschiedener Selektionsmarker (Puromycin N-Acetyltransferase, bzw. Blasticidin S Deaminase) wurde gewährleistet, dass die neu generierte Zelllinie ausschließlich aus Zellen bestand, welche beide Transpositionskassetten ins Genom integriert haben und somit beide Transgene exprimierten.

Für mikroskopische Untersuchungen, sowie Versuche unter Verwendung eines Protein-*tags* wurden zusätzlich pSB-Vektoren mit D11, bzw. D11m eingesetzt, die C-terminal mit einem mCherry-*tag* fusioniert sind (Abb. 3.3B).

Des Weiteren wurde für CoIP-Versuche eine verkürzte Version des D11 verwendet. Dieses setzt sich aus der CXXC Domäne von MLL und der PWWP Domäne von LEDGF zusammen und wird MTM (*minimal-targeting-module*) genannt. Über einen HA-*tag* ist das MTM an die humane pSer Domäne von AF4, bzw. an die murine pSer Domäne von Af4 fusioniert (Abb. 3.3C).

Der transgenlose Vektor, pSBtet_ohneLuc_P, bei dem das Luciferase-Platzhaltergen über einen *Sfi*I und Kleenow Verdau entfernt und der Vektor anschließend mittels *blunt-end* Ligation wieder religiert wurde, diente als Leervektorkontrolle zur Generierung einer Kontrollzelllinie (*mock*) für alle durchgeführten Versuche (Abb. 3.3D).

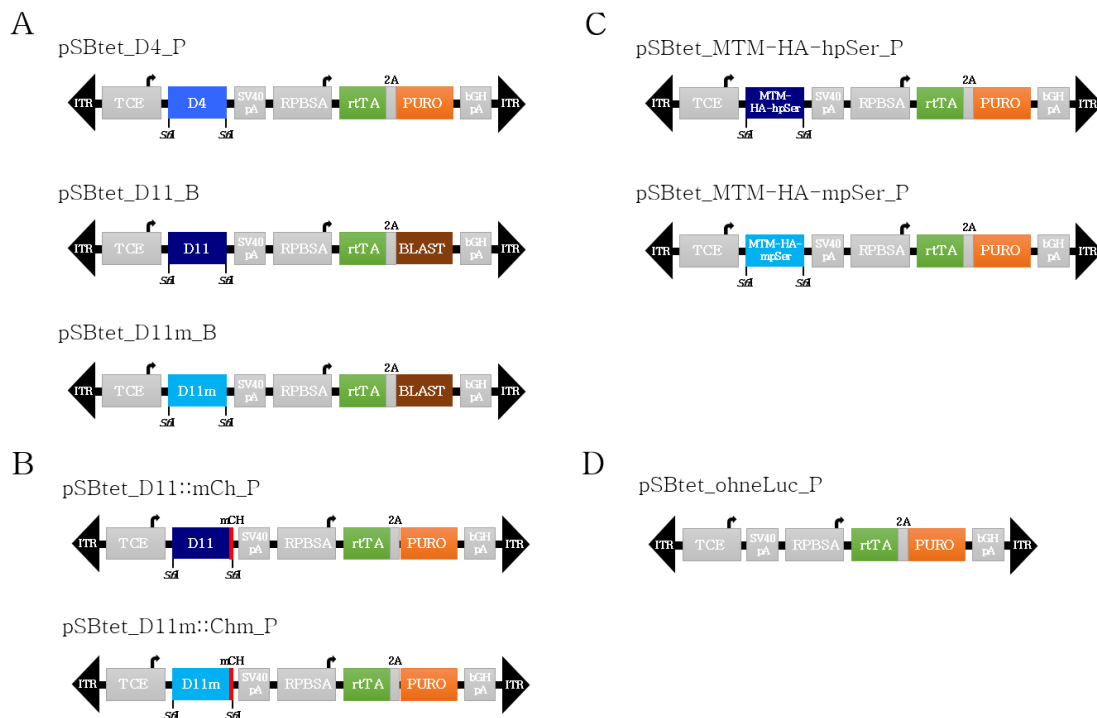


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der verwendeten Transpositionskassetten. Zur Generierung von stabilen, induzierbaren t(4;11) fusionsgenexprimierenden HEK 293T Zelllinien wurden die *Sleeping Beauty* Transpositionskassetten der SB-Vektoren verwendet. (A) Transpositionskassetten mit den über *SfiI* Restriktionsschnittstellen eingefügten Fusionsgenen D4 (*AF4-MLL*), D11 (*MLL-AF4*) & D11m (*MLL-AF4mpSer*). (B) Transpositionskassetten mit den Fusionsgenen D11 (*MLL-AF4*) & D11m (*MLL-AF4mpSer*) mit C-terminalem mCherry-tag (mCh). (C) Transpositionskassetten mit den Fusionsgenen MTM (*minimal targeting module*)-HA(-tag)-hpSer (humane pSer Domäne) & MTM (*minimal targeting module*)-HA(-tag)-mpSer (murinisierte pSer Domäne). (D) Transpositionskassette ohne Fusionsgen (*mock* Kontrolle). ITR, *inverted tandem repeat*; TCE, *tetracycline response element and minimal CMV-promoter enhanced*; SV40pA, SV40-Poly-Adenylierungssequenz; RPBSA, synthetischer, konstitutiver Promotor; rtTA, *reverse tetracycline trans activator*; Puro, Puromycin N-Acetyltransferase; Blast, Blasticidin S Deaminase; bGHpA, Poly-Adenylierungssequenz; 2A Peptidschnittstelle, Pfeile, Transkriptionsstartseiten, *SfiI*, Restriktionsschnittstelle der Restriktionsendonuklease *SfiI*

Nach mehrmaliger Selektion mit Puromycin, bzw. Blasticidin S wurde die Expression der verschiedenen Fusionsgene in den neu generierten Zelllinien durch Zugabe von Doxycyclin für 48 h induziert, RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels spezifischer Starteroligonukleotide wurde

anschließend die Expression der Fusionsgene in einer PCR Reaktion bestätigt (Abb. 3.4).

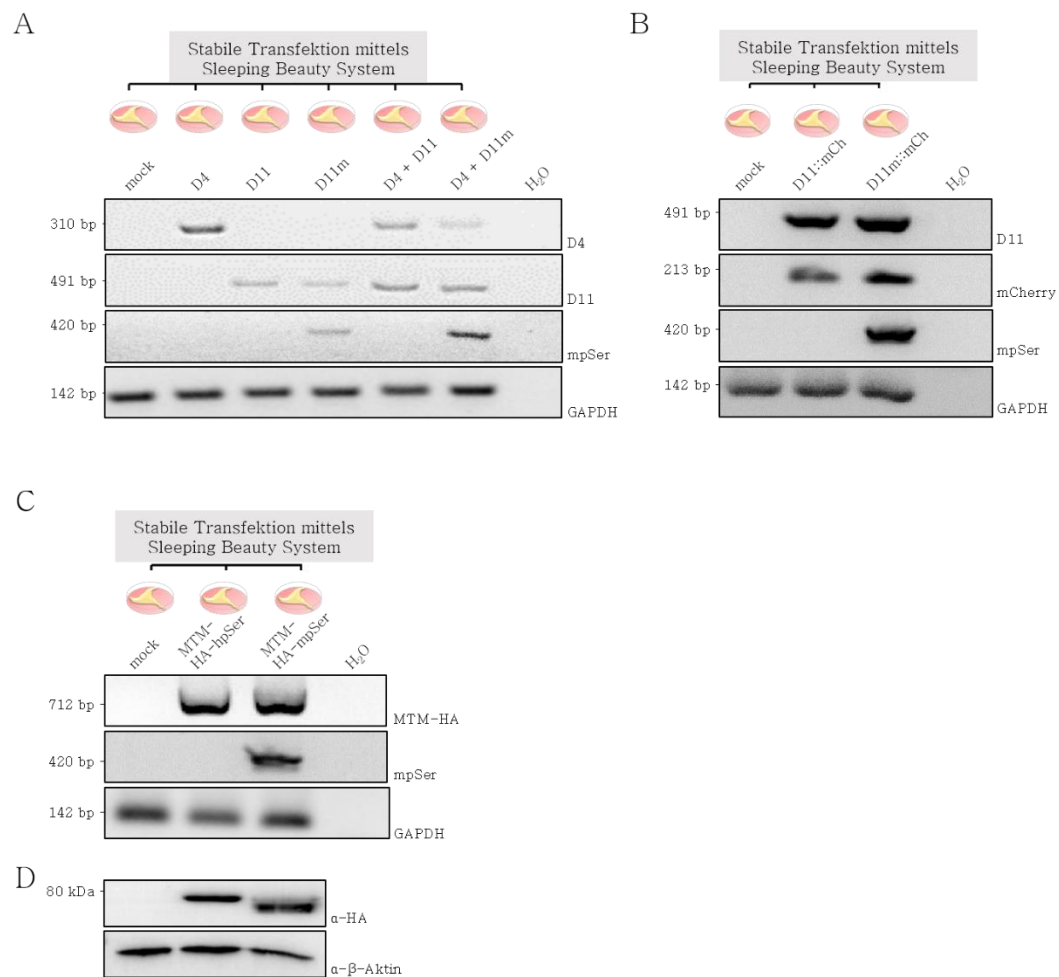


Abb. 3.4 Nachweis der Expression der t(4;11) Fusionsgene in induzierbaren HEK 293T Zelllinien. (A-C) PCR Amplifizierung der Transgene. Nach 48 h Induktion der Transgenexpression mit 1 µg/ml Doxycyclin wurde RNA isoliert & diese in cDNA umgeschrieben. Die mit spezifischen Starteroligonukleotiden an der cDNA generierten PCR Fragmente wurden anschließend auf einem 2 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. *GAPDH* diente als Positiv- & H₂O als Negativkontrolle. (D) Die Expression der MTM-HA-Transgene wurde zusätzlich durch Western Blot Analyse auf Proteinebene nachgewiesen. Dazu wurden nach 48 stündiger Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin Gesamtproteinextrakt aus den einzelnen Zelllinien isoliert & die MTM-HA-Transproteine mittels eines α-HA-Antikörpers nachgewiesen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Zur generellen Überprüfung der cDNA dienten Starteroligonukleotide gegen das Haushaltsgen *GAPDH* (Abb. 3.4). Als Negativkontrolle diente H₂O. Die amplifizierten PCR Produkte wurden auf ein 2 %iges TBE-Agarosegel

aufgeladen und aufgetrennt. Die unterschiedlichen verwendeten Starteroligonukleotide zum Transkriptnachweis waren in der Lage die Zielsequenz, sofern diese in den Zellen exprimiert wurde, zu binden und diese in einer PCR Reaktion zu amplifizieren. Zum Nachweis von D4 wurden die Starteroligonukleotide D4.F und D4.R verwendet, welche ein 142 bp Fragment generieren. Wie in Abb. 3.4A zu sehen ist, wurde D4 in der entsprechenden Einzel-, sowie in den beiden doppelt transfizierten Zelllinien exprimiert. Die Expression von D11 wurde mit Hilfe der Starteroligonukleotide D11.F und Der11.R überprüft. Das dabei generierte PCR Produkt hatte eine Länge von 491 bp. Da sich die Starteroligonukleotide in einem Bereich um den Bruchpunkt zwischen MLL und AF4 befinden, ist dieses Produkt sowohl bei D11, als auch bei D11m exprimierenden Zelllinien generierbar. Entsprechende Fragmente sind bei Abb. 3.4A+B zu erkennen. Für den Nachweis der murine pSer Domäne wurden die Starteroligonukleotide verwendet, welche auch für die Klonierung der selbigen genutzt wurden. Af4.pSer.F und Af4.pSer.R generierten ein 420 bp langes Fragment welches in allen Zelllinien mit Transgenen mit murine pSer Domäne detektiert werden konnte (Abb. 3.4A-C). Für die Ziellinien, welche die mCherry Fusionen von D11 und D11m (D11::mCh und D11m::mCh) exprimieren sollten wurde zusätzlich die Anwesenheit des mCherry-tags mit den Starteroligonukleotiden mCherry.f und mCherry.r verifiziert. Das zu amplifizierende PCR-Produkt besaß eine Länge von 213 bp und ist in den entsprechenden Zelllinien vorhanden (Abb. 3.4B). Ebenfalls wurden bei den Zelllinien, die zur CoIP genutzt werden sollten, welche mit pSB-Vektoren mit den verkürzten D11-Versionen MTM-HA-hpSer und MTM-HA-mpSer transfiziert wurden, die Anwesenheit der MTM-Transkripte bestätigt. Dazu wurden die Starteroligonukleotide MTM.F und HA.R verwendet. Das entsprechende Amplifikat mit 720 bp ist in den jeweiligen Spuren zu erkennen (Abb. 3.4C). Zusätzlich wurde die Expression dieser Transgene ebenfalls auf Proteinebene über einen Western Blot nachgewiesen. Dazu wurde die Expression der Transgene ebenfalls für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert und von den Zellen anschließend Proteinlysate hergestellt. Der Proteinnachweis der MTM-Proteine, mit einer prognostizierten molekularen Masse von 45 kDa für MTM-HA-hpSer und 41 kDa für MTM-HA-mpSer, erfolgte mittels eines α -HA Antikörpers. Die detektierten Proteine wiesen eine apparente Größe von ca. 75 und 65 kDa auf (Abb. 3.4D).

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Expression der verschiedenen Transgene in den neu etablierten stabilen HEK 293T Zelllinien, sollte zunächst der Einfluss dieser auf die Viabilität der Zellen untersucht werden.

3.1.4 Viabilität von t(4;11) fusionsgenexprimierenden HEK 293T Zellen

Nach der Generierung stabiler HEK 293T Zelllinien, sollte zuerst der Einfluss der verschiedenen t(4;11) Fusionsgene auf die Viabilität der Zellpopulation untersucht werden. Dazu wurde die Expression der verschiedenen Transgene für 48h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert und die Viabilität anschließend mit Hilfe von Acridin Orange und DAPI (Solution13, Chemometec) und dem Programm „*Viability and Cell Count using NC-Slides™ – Mammalian Cells*“ am Nucleocounter NC-3000™ gemessen (Abb. 3.5).

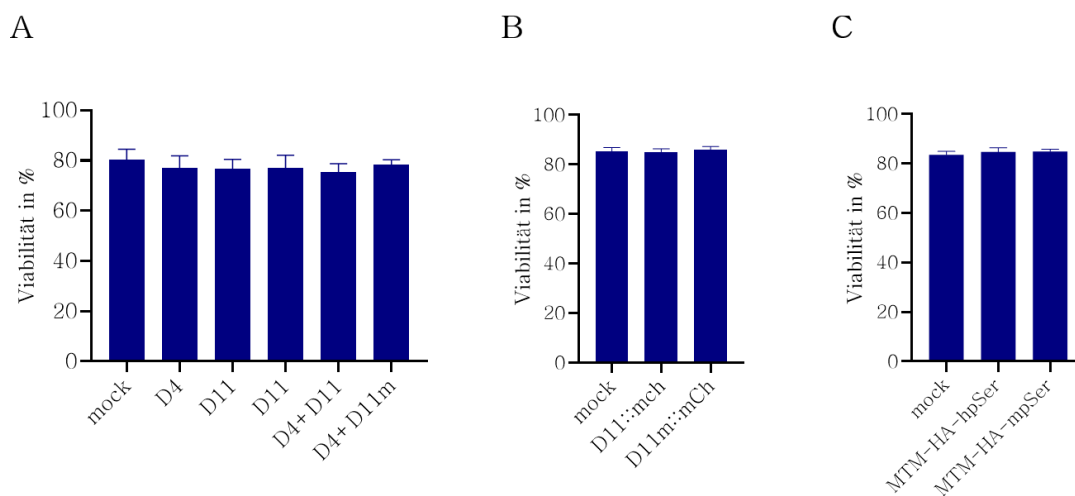


Abb. 3.5 Viabilitätsuntersuchung der t(4;11) transgenexprimierenden HEK 293T Zelllinien. Die Expression der Transgene wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Anschließend wurde die Viabilitätsmessung am Nucleocounter NC 3000™ unter Verwendung des Programms „*Viability and Cell Count using NC-Slides™ – Mammalian Cells*“ durchgeführt. Analysiert wurden stabile HEK 293T Zelllinien, neben *mock*, unter Expression folgender Transgene: **(A)** D4, D11, D11m & den Co-Expressionen D4+D11 & D4+D11m; **(B)** D11::mCh & D11m::mCh; **(C)** MTM-HA-hpSer & MTM-HA-mpSer. (n=3)

Die Bestimmung der Viabilität wird durch bildgebende Zytometrie mittels zweier Fluorophore gewährleistet. Dabei werden alle Zellen mit *Acridine Orange* gefärbt, wohingegen Zellen mit permeabler Membran DAPI aufnehmen, welches sich innerhalb der Nuklei an die DNA anlagert und diese färbt. Durch das Verhältnis von DAPI-positiven Zellen zu Gesamtzahl an *Acridine Orange* gefärbten Zellen wird die Viabilität vom NC-3000™ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Viabilität bei allen Zelllinien, fusionsgenunabhängig, bei um die 80 % lag. Somit zeigte sich, dass die Expression der verschiedenen Fusionsgene keinen Einfluss auf die generelle Viabilität der Zellen ausübte.

3.2 Einfluss von D11m auf das MLL Zielgen *HOXA9*

Das Homöoboxgen *HOXA9* gehört zu den Zielgenen von MLL. Im Kontext einer *MLL-r* Leukämie kann es u.a. zu einer aberranten Expression von *HOXA9* kommen (Luo *et al.*, 2012). Ob dies auch auf das chimäre D11m mit muriner pSer Domäne zutrifft sollte anhand von qPCR untersucht werden. Dazu wurden die *mock*, D11, bzw. D11m exprimierenden HEK 293T Zelllinien zur Expression der Transgene für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Im Anschluss wurde Gesamt RNA aus den Zellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und in der qPCR eingesetzt (Abb. 3.6). Zur Amplifikation von *HOXA9* wurden die Starteroligonukleotide HOXA9.F und HOXA9.R verwendet.

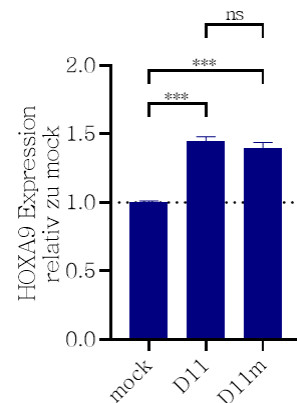


Abb. 3.6 Überprüfung des Einflusses von D11 & D11m auf die *HOXA9* Expression. Die Expression der stabilen Transgene D11 & D11m in HEK 293T Zellen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Nach erfolgter RNA Isolation & cDNA Synthese wurde die Expression des *HOXA9* Gens durch qPCR überprüft. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz diente die *mock* Zelllinie, deren normierte *HOXA9* Expression auf 1,0 gesetzt wurde. Die Analyse erfolgte durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (n=3; + S.E.M.).

Im Vergleich zur *mock* Zelllinien zeigte sich sowohl bei D11, als auch D11m exprimierenden Zellen eine signifikant gesteigerte *HOXA9* Expression etwa um den Faktor 1,4. Ein Unterschied zwischen D11 und D11m war hingegen nicht beobachtbar. D11m zeigt somit in Bezug auf die Expression von *HOXA9*, als MLL-Zielgen, einen vergleichbaren Einfluss.

3.3 Analyse der Genexpression der t(4;11) exprimierenden Zelllinien mittels MACE

Zur generellen Untersuchung des Einflusses der t(4;11) Fusionsgene auf die Genexpression wurden Genexpressionsanalysen mittels MACE-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurde von den t(4;11) exprimierenden HEK 293T Zelllinien nach 48 stündiger Induktion der Transgenexpression mit 1 µg/ml Doxycyclin RNA isoliert und deren Integrität durch Bestimmung des RIN^e-Wertes überprüft. Anschließend wurden die RNA Proben an die Firma GenXPro übergeben. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden mit Hilfe des Programms File Maker Pro analysiert.

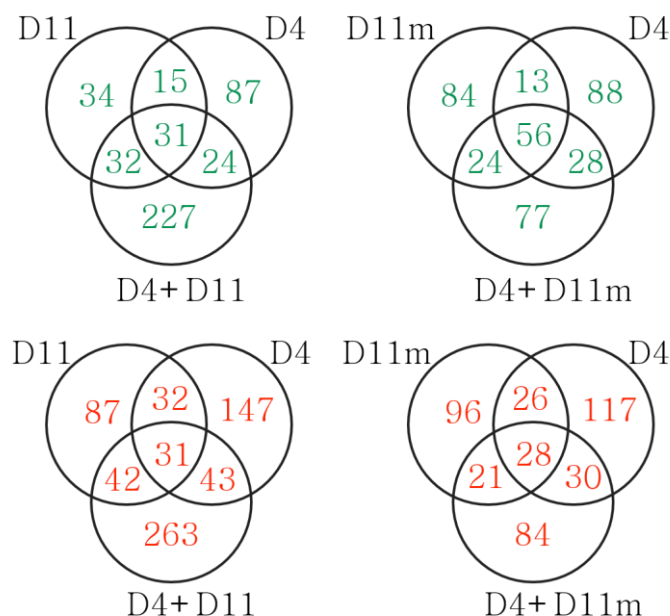


Abb. 3.7 VENN Diagramm der Genexpressionsstudien. Nach 48 h Induktion der Transgenexpression mit 1 µg/ml Doxycyclin wurde aus den sechs stabilen Zelllinien RNA isoliert & diese zur Sequenzierung an die Firma GenXPro übergeben. Die Analyse der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe des Programms File Maker Pro und einer Normalisierung auf *mock*. Grün, Anzahl der mehr als 4-fach hochregulierten Gene; rot, Anzahl der mehr als 4-fach runterregulierten Gene.

Die Expressionsdaten wurden auf die *mock* Zelllinie bezogen und nur Expressionsunterschiede von $\log^2 > \pm 2$ berücksichtigt. Dargestellt wurden die Daten im VENN Diagramm (Abb. 3.7). Für die Expression aller t(4;11) Fusionsgene ist ein Einfluss auf die generelle Genexpression ersichtlich. Es existieren sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene im Vergleich zu *mock*. Neben einer geringen Anzahl an Genen die sowohl die einzelnen, als auch die co-exprimierenden Zelllinien gemeinsam regulieren, führte die Transgen-

expression in jeder Zelllinie zur Regulation jeweils spezifischer Gene. Dabei war die Anzahl an runterregulierten Genen jeweils höher als die Zahl hochregulierter Gene. Beim Vergleich von D11 und D11m zeigt sich der Einfluss von D11m auf eine größere Zahl an Deregulierungen als bei D11. Vergleicht man des Weiteren die Anzahl deregulierter Gene in den co-transfizierten Zelllinien, zeigten sich bei D4+ D11 227 hochregulierte und 263 runterregulierte Gene. Im Vergleich dazu wiesen D4+ D11m exprimierende Zellen nur 77 hochregulierte und 84 runterregulierte Gene auf. Dies verdeutlicht einen synergistischen Effekt durch die Kooperation von D4+ D11, welcher bei D4+ D11m nicht vorhanden zu sein scheint. Die stärkere Runterregulierung von Genen, sowie Spezifität der Gensignaturen der verschiedenen Einzel- und Co-Transgene spiegeln sich auch in der *Heatmap* und dem *Volcano Plot* wider (Abb. 3.8+ Abb. 3.9).

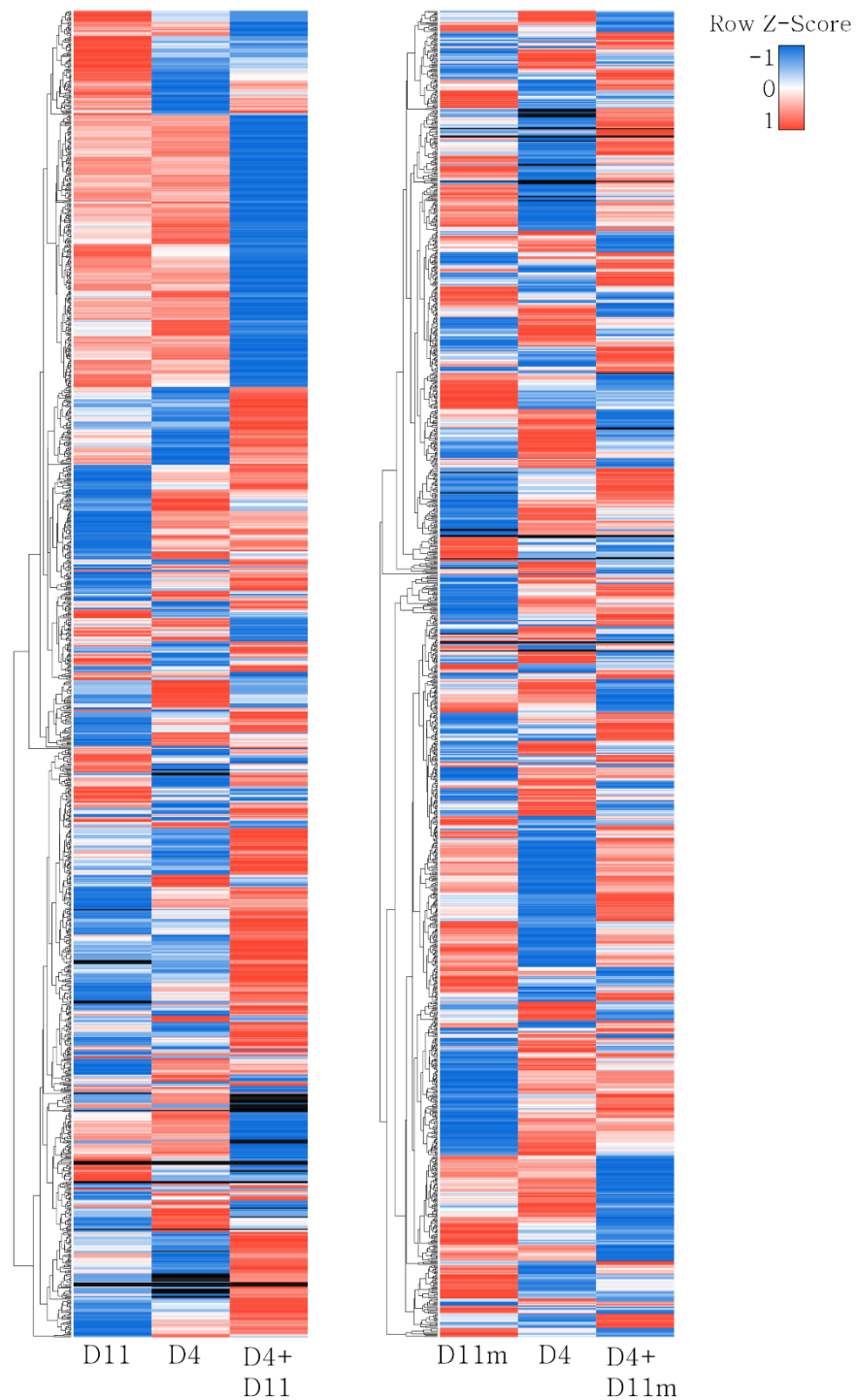


Abb. 3.8 Heatmap der Genexpressionsstudien. Nach 48 h Induktion der Transgenexpression mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin wurde aus den stabilen Zelllinien RNA isoliert & diese zur Sequenzierung an die Firma GenXPro übergeben. Die Analyse der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe des Programms File Maker Pro und einer Normalisierung auf *mock*. Die Erstellung der *Gene Expression Heatmaps* erfolgte auf der Webseite <http://www.heatmapper.ca/expression/>. Rot: Gen überexprimiert; blau: Gen herunterreguliert; weiß: Gen abwesend; schwarz: identische Genexpression.

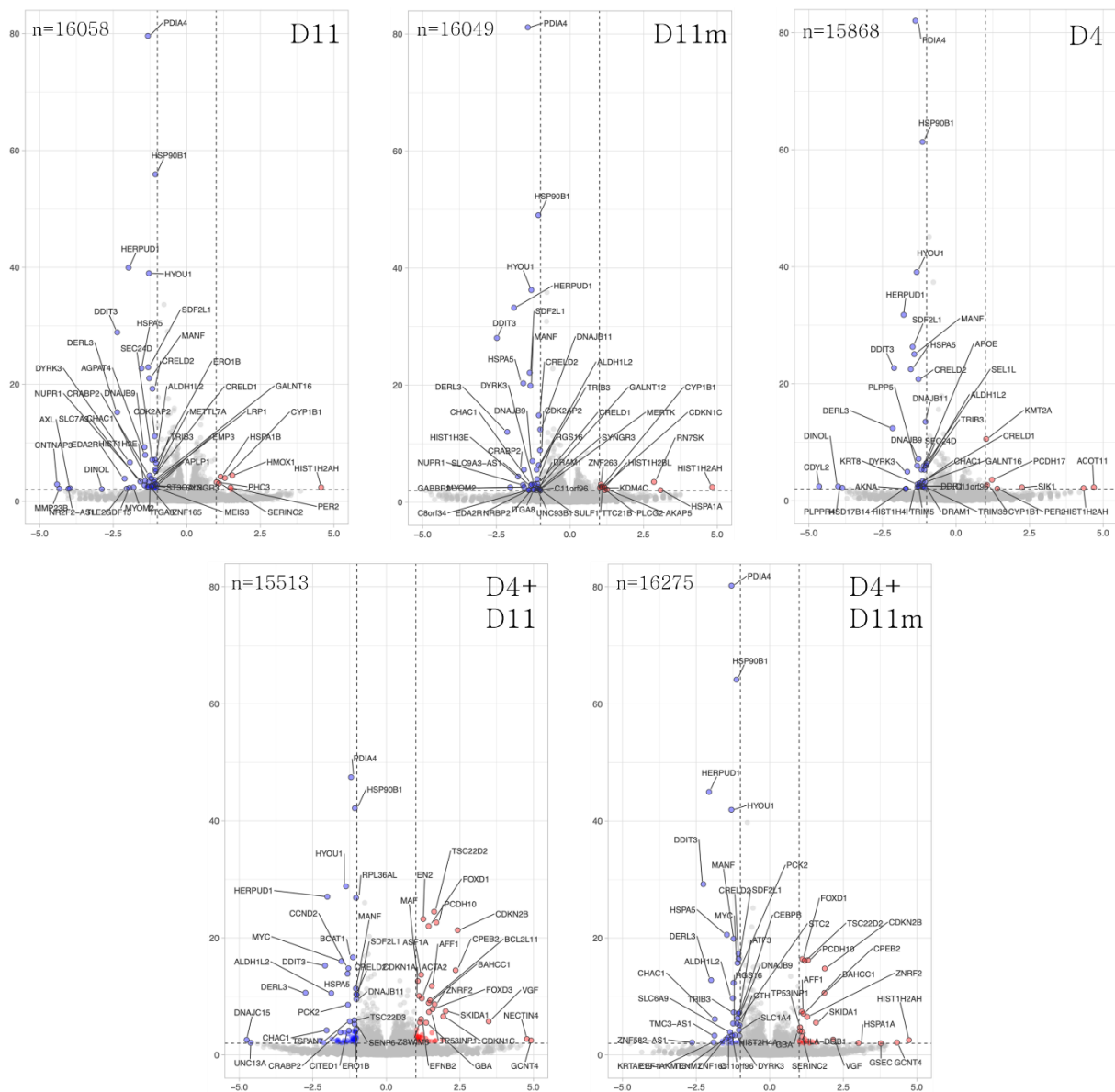


Abb. 3.9 Volcano Plot der Genexpressionsstudien. Nach 48 h Induktion der Transgenexpression mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin wurde aus den stabilen Zelllinien RNA isoliert & diese zur Sequenzierung an die Firma GenXPro übergeben. Die Analyse der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe des Programms File Maker Pro und einer Normalisierung auf *mock*. Die Erstellung der *Volcano Plots* erfolgte mit Hilfe der Webseite <https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR/>. Rot: Gen signifikant überexprimiert; blau: Gen signifikant herunterreguliert, grau: weniger stark deregulierte Gene (*cutoff* ist $\log_2 \pm 1$), Horizontale Achsenbeschriftung: \log_2 change gene expression; vertikale Achsenbeschriftung: $\log_{10}(\text{p-value}) = \text{Signifikanz}$

3.4 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf den Nukleolus und die Ribosomenbiosynthese

Die Ribosomenbiosynthese (RiBi) ist ein essentieller und komplexer Prozess zur Produktion von Ribosomen. Dieser gewährleistet die Proteintranslation und ermöglicht dadurch Zellwachstum und das Adaptieren an wechselnde Bedingungen, welches zum Überleben der Zelle notwendig ist. Da es sich bei Ribosomen um Ribonukleoproteine handelt sollen im Folgenden die Komponenten an unterschiedlichen Stellen des Biosyntheseweges untersucht werden.

3.4.1 Interaktion der humanen und murinen pSer Domäne mit dem SL1-Komplex

Die Transkription der rDNA durch die Pol I stellt den ersten Schritt der RiBi dar. Nachdem die Interaktion der pSer Domäne von AF4 und MLL-AF4 (D11) mit dem SL1 Komplex des Präinitiationskomplexes (PIC) der Pol I in der Literatur bereits gezeigt wurde, sollte untersucht werden ob diese Interaktion auch für die murine pSer Domäne nachgewiesen werden kann. Stellvertretend für den SL1-Komplex sollte die Bindung an TAF_IC, als eine Komponente des Komplexes, nachgewiesen werden. Dafür wurden die stabilen HEK 293T Zelllinien mit den induzierbaren Transgenen MTM-HA-hpSer und MTM-HA-mpSer transient mit pSBtet_TAF_IC::GFP_B transfiziert und am Folgetag für 48 h durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Aus den daraus hergestellten Proteinlysaten wurde mit Hilfe des GFP-*tags* das TAF_IC::GFP über einen α-GFP-Antikörper an magnetische *beads* gebunden, immunopräzipitiert und aufgereinigt. Durch anschließende SDS-PAGE und Western Blot konnten co-eluierte MTM-HA-h/mpSer Proteine, über die Bindung an die jeweilige pSer Domäne, durch einen α-HA-Antikörper detektiert werden (Abb. 3.10A).

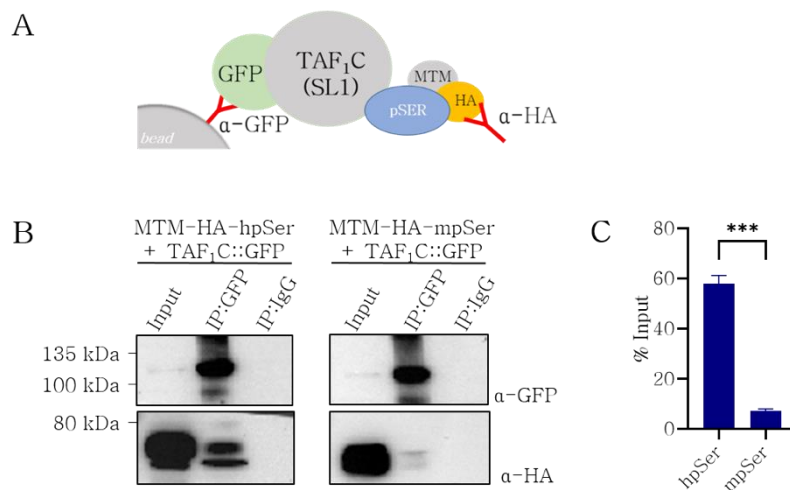


Abb. 3.10 Überprüfung der Interaktion zwischen TAF₁C (SL1) & der humanen, bzw. murinen pSer Domäne. Die stabilen HEK 293T Zelllinien mit den Transgenen MTM-HA-hpSer, bzw. MTM-HA-mpSer wurden transient mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transfiziert und die Expression der Transgene durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Vom gewonnenen Proteinlysate wurden 200 µg für die CoIP und den anschließenden Western Blot eingesetzt. **(A)** CoIP Schema: Die Immunopräzipitation von TAF₁C::GFP erfolgte über α-GFP-gekoppelte magnetische *beads* und die Detektion von co-eluiertem MTM-HA-h/mpSer erfolgte über einen α-HA Antikörper im Western Blot. **(B)** Western Blot nach CoIP. 1. Spur: Lysatkontrolle, 15 % *Input*; 2. Spur: α-GFP Immunopräzipitat; 3. Spur: unspezifisches α-IgG-Präzipitat (Negativkontrolle). **(C)** Quantifizierung des co-präzipitiertem MTM-HA-h/mpSer in Bezug zum jeweiligen *Input*. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Beim Vergleich der *Input*-Proben der beiden Proteinlysate von MTM-HA-hpSer und MTM-HA-mpSer exprimierenden Zelllinien mit den jeweiligen Präzipitaten war eine Anreicherung des transient transfizierten TAF₁C::GFP (120 kDa), mit einer apparenten Masse von ca. 120 kDa, durch Detektion mit einem α-GFP Antikörper deutlich erkennbar (Abb. 3.10B). Die MTM-HA-pSer Proteine sind durch einen α-HA Antikörper detektiert worden und in beiden *Input* Proben mit apparenten Massen von ca. 75 und 65 kDa, sehr prominent vorhanden gewesen. In den Präzipitaten hingegen war im Vergleich zu MTM-HA-hpSer deutlich weniger MTM-HA-mpSer detektierbar. Relativ zum *Input* entsprach das 58 % co-eluiertes hpSer und 7 % co-eluiertes mpSer (Abb. 3.10C). Ein unspezifischer α-IgG-Antikörper diente als Negativkontrolle für die Immunopräzipitation. Somit konnte eine Co-Elution von humaner pSer Domäne mit TAF₁C bestätigt und eine Co-Elution mit der murinen pSer Domäne gezeigt werden, wobei diese deutlich schwächer ausfiel.

3.4.2 Lokalisationsstudien

3.4.2.1 Nukleoläre Lokalisation von D11 & D11m

In CoIP Versuchen konnte gezeigt werden, dass beide pSer Domänen von AF4/Af4 mit TAF_IC interagieren (Abb. 3.10). Da es sich bei TAF_IC um eine Komponente des SL1 Komplexes handelt, einem PIC-Faktor der Pol I im Nukleolus, sollte im Folgenden die subnukleäre Lokalisation untersucht werden. Diese sollte zum einen mikroskopisch mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper und zum anderen durch den Nachweis einer direkten Bindung an den rRNA Promotor über ChIP erfolgen. Dafür wurden die HEK 293T Zelllinien, welche D11 und D11m mit C-terminalem mCherry-*tag* (D11::mCh & D11m::mCh) stabil exprimierten, zusammen mit der *mock*-Zelllinie verwendet. Diese wurden auf Glaskammerobjektträgern ausgebracht, die Expression der Transgene für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert und die Zellen anschließend auf dem Glasobjektträger fixiert. Nach den Inkubationen mit den jeweiligen Primär- und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern, sowie eine DAPI-Färbung erfolgte die Visualisierung der Zellen und Fluoreszenzsignale am Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 von Carl Zeiss (Abb. 3.11).

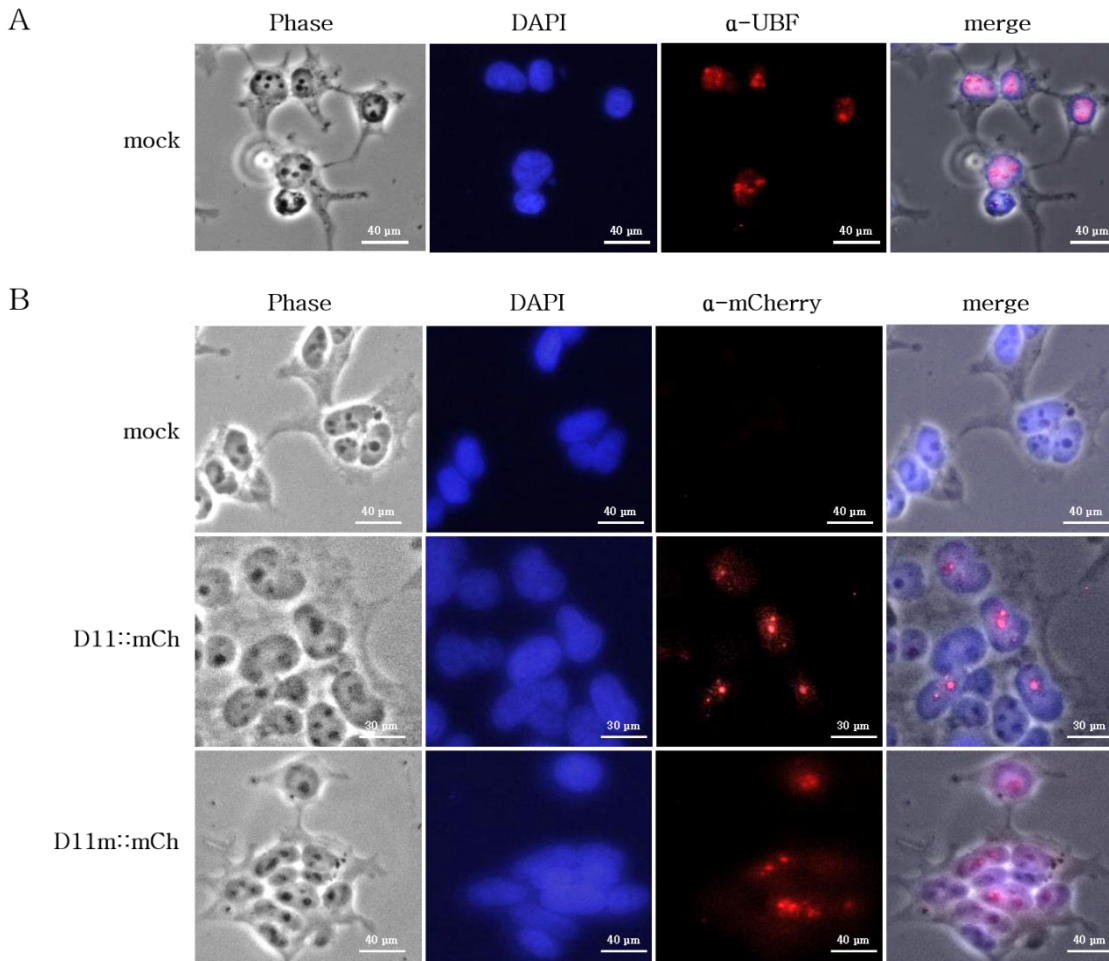


Abb. 3.11 Lokalisation von D11::mCh & D11m::mCh. Zur Lokalisation von D11::mCh & D11m::mCh wurden stabile HEK 293T Zelllinien (inklusive *mock* Kontrolle) auf Glasobjektträgern ausgebracht und die Transgenexpression für 48 h durch Zugabe von 1 μg/ml Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert & eine Immunofärbung durchgeführt. **(A)** Nachweis von Nukleoli durch UBF-Färbung mit α-UBF + α-Maus IgG-Alexa Fluor®586. **(B)** Lokalisation von D11::mCh & D11m::mCh durch mCh-Färbung mit α-mCh + α-Maus IgG-Alexa Fluor®586. 1. Spalte: Phasenkontrast; 2. Spalte: DAPI-Signal (Zellkernmarkierung); 3. Spalte mCh-Signal (UBF/mCh-Markierung); 4. Spalte: *merge* (Spalten1-3 übereinander gelegt)

Die Färbung der Nuklei erfolgte mit DAPI. Bereits im Durchlichtmikroskop sind Nuklei vom Cytoplasma unterscheidbar. Innerhalb der Nuklei waren kleinere, runde Strukturen mit erhöhter Dichte als dunkle Punkte erkennbar. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen um Nukleoli handelt wurden die Zellen der *mock* Zelllinie zunächst mit einem α-UBF Antikörper, als Marker für Nukleoli, angefärbt (Abb. 3.11A). Die UBF-Fluoreszenzsignale waren, verglichen mit dem DAPI Panel, ausschließlich im Nukleolus vorzufinden. Ebenso war erkennbar, dass die stärksten Signale mit den im Phasenpanel erkennbaren kleineren Strukturen übereinstimmen und diese als Nukleoli bestätigten.

Anstelle eines α -UBF Antikörpers wurden im Anschluss zur Lokalisation von D11::mCh und D11m::mCh ein α -mCherry Antikörper zur Fluoreszenzfärbung verwendet (Abb. 3.11B). Als Kontrolle diente die *mock* Zelllinie, bei welcher, durch das Fehlen eines mCherry-Konstruktes, kein entsprechendes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Im Gegenzug dazu konnten bei beiden D11::mCh und D11m::mCh exprimierenden Zelllinien mCherry-bedingte Signale beobachtet werden. Für beide befanden sie sich, vergleichbar mit den UBF-Signalen, innerhalb der Nukleoli der Zellen. Eine nukleoläre Lokalisation konnte damit sowohl für D11::mCh, als auch für D11m::mCh gezeigt werden.

Des Weiteren wurde durch ChIP und anschließender qPCR untersucht, ob D11::mCh, bzw. D11m::mCh direkt an das Chromatin im Bereich des rRNA Promotors binden. Dazu wurden die transgenexprimierenden Zelllinien *mock*, D11::mCh und D11m::mCh nach 48 stündiger Induktion der Transgenexpression lysiert und chromatingebundene Proteine doppelfixiert. Mittels eines α -mCherry Antikörpers wurden D11::mCh und D11m::mCh zusammen mit gebundenem Chromatin über magnetischen *beads* präzipitiert, aufgereinigt und eluiert. Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer α -IgG Antikörper. Nach der Aufreinigung der co-eluierten DNA wurde diese in einer qPCR Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation des rRNA Promotorbereichs wurden die Starteroligonukleotide rRNA.Prom.for und rRNA.Prom.rev verwendet. Sie binden innerhalb der beiden hochkonservierten Motife UE und CE. Das Amplifikat repräsentiert dadurch alle rDNA Einheiten innerhalb der Zellen. Die Auswertung der qPCR Daten der ChIP Versuche erfolgte nach der „percent input“ Methode von *Life Technologies* (Abb. 3.12).

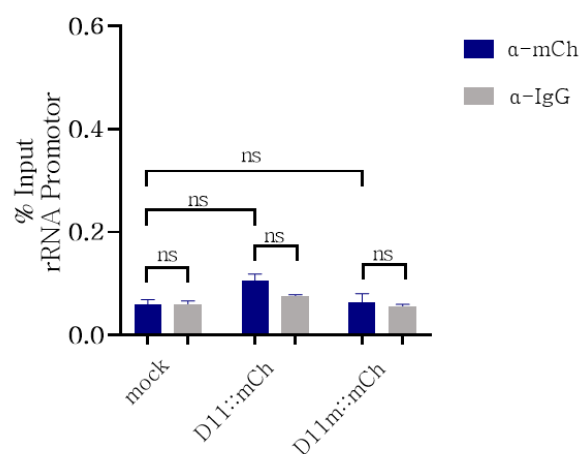


Abb. 3.12 Chromatin-Immunopräzipitation zur Untersuchung der Bindung von D11::mCh, bzw. D11m::mCh am rRNA Promotor. Die Expression von *mock*, D11::mCh & D11m::mCh in den HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin induziert. Nach einer Doppelfixierung von Proteinen und Chromatin wurden D11::mCh, bzw. D11m::mCh mittels eines α -mCh

Antikörpers immunopräzipitiert (blau). Ein unspezifischer α -IgG Antikörper diente als Negativkontrolle (grau). Anschließend wurde durch qPCR die Bindung an den rRNA Promotor untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, gemessen in Triplikaten (+ S.E.M.). Die Auswertung erfolgte nach der „percent input“ Methode von *Life Technologies* (Thermo Fisher Scientific). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem unpaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Es zeigte sich bei allen drei Zelllinien kein Unterschied in der Co-Elution des rDNA Promotors im Vergleich zur Negativkontrolle mit IgG-Präzipitation. Alle ermittelten Werte lagen in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,1 % *Input*. Dadurch lässt sich feststellen, dass D11::mCh, sowie auch D11m::mCh, trotz nukleolärer Lokalisation, nicht direkt an den rRNA Promotor binden.

3.4.2.2 Beeinflussung der nukleolären Lokalisation der RNA Polymerase II durch D11 & D11m

Okuda *et. al* identifizierten einen neuen Mechanismus zur Transkriptionsinitiation der Pol II durch die Interaktion zwischen AF4/D11 und TAF_IC (SL1). Als Komponente des PIC der Pol I ist SL1 im Nukleolus lokalisiert. Nachdem in Kapitel 3.4.2.1 die Lokalisation von D11 und D11m im Nukleolus gezeigt werden konnte, sollte nun im Folgenden der Einfluss beider Fusionsproteine auf die subnukleäre Lokalisation der Pol II untersucht werden. Dazu wurden die HEK 293T Zelllinien, welche den Leervektor (*mock*), D11::mCh und D11m::mCh nach 48 stündiger Induktion der Transgenexpression durch Zugabe von 1 μ g/ml Doxycyclin exprimierten, auf Glasobjektträgern fixiert und die Pol II mit Hilfe eines α -Pol II Primärantikörpers und entsprechendem, fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörpers markiert. Die Nuklei wurden mit Hilfe von DAPI angefärbt. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 von Zeiss (Abb. 3.13).

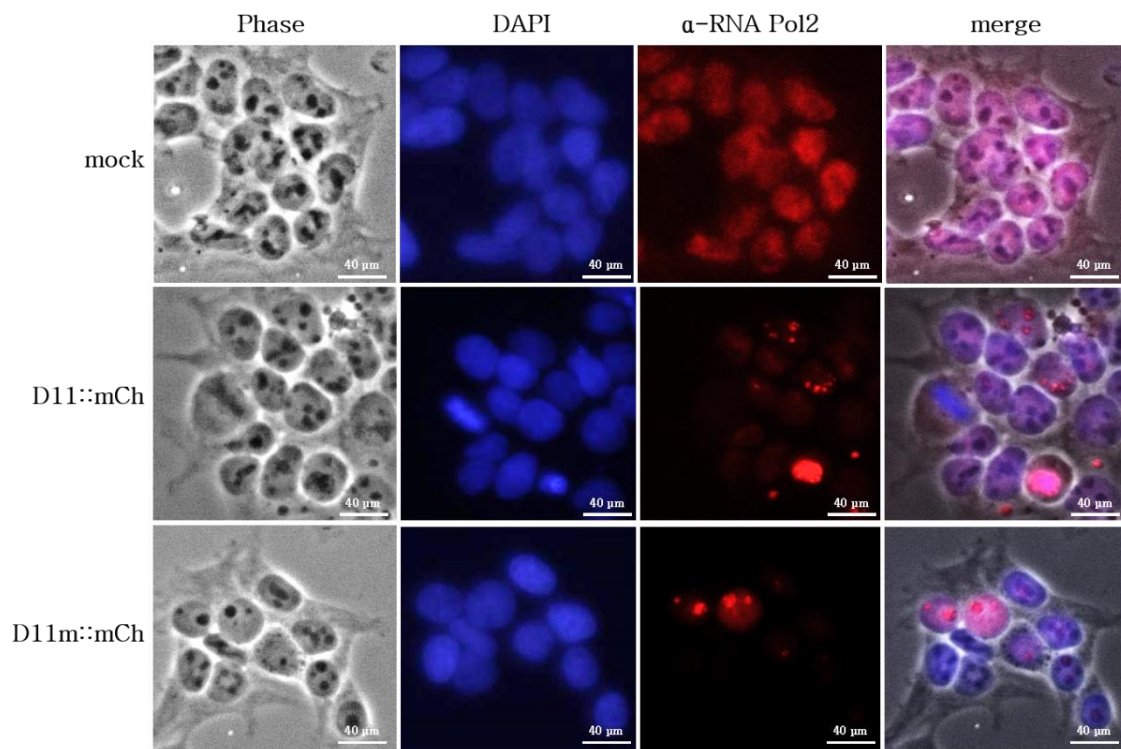


Abb. 3.13 Lokalisation der Pol II. Zur Lokalisation der Pol II wurden stabile HEK 293T Zelllinien (inklusive *mock* Kontrolle) auf Glasobjektträgern ausgebracht & die Transgenexpression von D11::mCh, bzw. D11m::mCh für 48 h durch Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert & eine Immunofärbung zur Lokalisation der Pol II mit α -Pol II + α -Maus IgG-Alexa Fluor®586 durchgeführt. 1. Spalte: Phasenkontrast; 2. Spalte: DAPI-Signal (Zellkernmarkierung); 3. Spalte Pol II-Signal; 4. Spalte: *merge* (Spalten1-3 übereinander gelegt)

Bereits im Phasenkontrast waren Cytoplasma, Nuklei und Nukleoli voneinander unterscheidbar. Bei der Fluoreszenzmarkierung der Pol II unterschied sich die *mock* Zelllinien von den D11::mCh und D11m::mCh exprimierenden Zellen. Während bei *mock* das Fluoreszenzsignal im Nukleus relativ gleichmäßig erschien, fluoreszierte es in den Nukleoli deutlich schwächer. Bei den fusionsgenexprimierenden Zelllinien hingegen war das Fluoreszenzsignal vor allem punktuell und auch innerhalb der Nukleoli zu detektieren. Unter Expression von D11::mCh und D11m::mCh ist die Pol II somit auch in den Nukleoli lokalisiert.

Auch für die Pol II sollte durch ChIP und anschließender qPCR untersucht werden, ob die Pol II direkt an das Chromatin im Bereich des rRNA Promotors bindet. Dazu wurden auch hier die transgenexprimierenden Zelllinien *mock*, D11::mCh und D11m::mCh nach 48 stündiger Induktion der Transgenexpression lysiert und chromatingebundene Proteine doppelfixiert. Mit Hilfe

eines α -Pol II Antikörpers wurde die Pol II zusammen mit gebundenem Chromatin mittels magnetischer *beads* präzipitiert, aufgereinigt und eluiert. Als Negativkontrolle diente ebenfalls ein unspezifischer α -IgG Antikörper. Nach der Aufreinigung der co-eluierten DNA wurde diese in einer qPCR Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation des rRNA Promotorbereichs wurden auch hier wieder die Starteroligonukleotide rRNA.Prom.for und rRNA.Prom.rev eingesetzt. Wie bereits erwähnt binden sie innerhalb der beiden hochkonservierten Motife UE und CE. Das resultierende Amplifikat repräsentiert alle rDNA Einheiten innerhalb der Zellen. Die Auswertung der qPCR Daten der CHIP Versuche erfolgte nach der „percent input“ Methode von *Life Technologies* (Abb. 3.14).

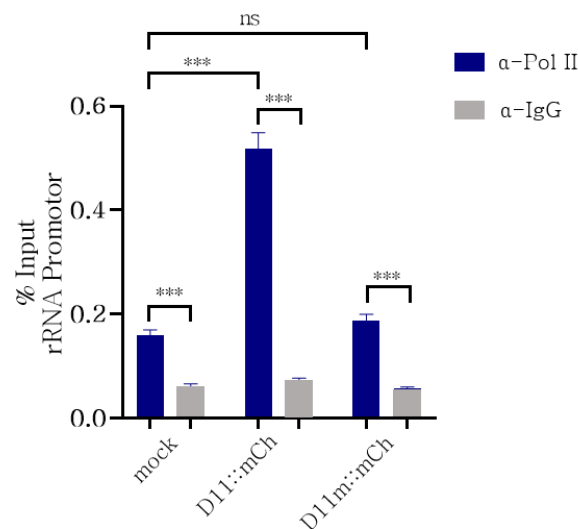


Abb. 3.14 Chromatin-Immunopräzipitation zur Untersuchung des Einflusses von D11::mCh & D11m::mCh auf die Bindung der Pol II am rRNA Promotor. Die Expression von *mock*, D11::mCh & D11m::mCh in den HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin induziert. Nach einer Doppelfixierung von Proteinen & Chromatin wurde die Pol II mittels eines α -Pol II Antikörpers immunopräzipitiert (blau). Ein unspezifischer α -IgG Antikörper diente als Negativkontrolle (grau). Anschließend wurde durch qPCR die Bindung an den rRNA Promotor untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, gemessen in Triplikaten (+S.E.M.). Die Auswertung erfolgte nach der „percent input“ Methode von *Life Technologies* (Thermo Fisher Scientific). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem unpaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Die Auswertung der CHIP-Daten ergab eine Anreicherung der DNA des rRNA Promotors an die Pol II in allen drei Zelllinien. Diese war signifikant gegenüber der Negativkontrolle mit IgG. Während diese bei der *mock* Zelllinie und D11m::mCh 0,18, bzw. 0,2 % des *Inputs* betrug, zeigte die Zelllinie unter

Expression von D11::mCh eine deutliche Erhöhung um 0,5 % des *Inputs*. Somit lässt sich festhalten, dass in Anwesenheit von D11::mCh und D11m::mCh die Pol II verstärkt im Nukleolus lokalisiert ist und bei D11::mCh exprimierenden Zellen zusätzlich verstärkt am rRNA Promotor gebunden vorliegt.

3.4.3 Änderung der nukleolären Morphologie durch D11::mCh & D11m::mCh

Nachdem für D11::mCh und D11m::mCh eine nukleoläre Lokalisation gezeigt werden konnte (Abb. 3.11), sollte im Folgenden der Einfluss dieser auf Morphologie und Anzahl der Nukleoli von D11, bzw. D11m exprimierender HEK 293T Zellen im Vergleich zu *mock* untersucht werden. Diese wurden auf Glaskammerobjektträgern ausgebracht, die Expression der Transgene für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert, die Zellen anschließend auf dem Glasobjektträger fixiert und mit Hilfe von Durchlicht am Mikroskop Observer Z1 von Carl Zeiss betrachtet (Abb. 3.15A).

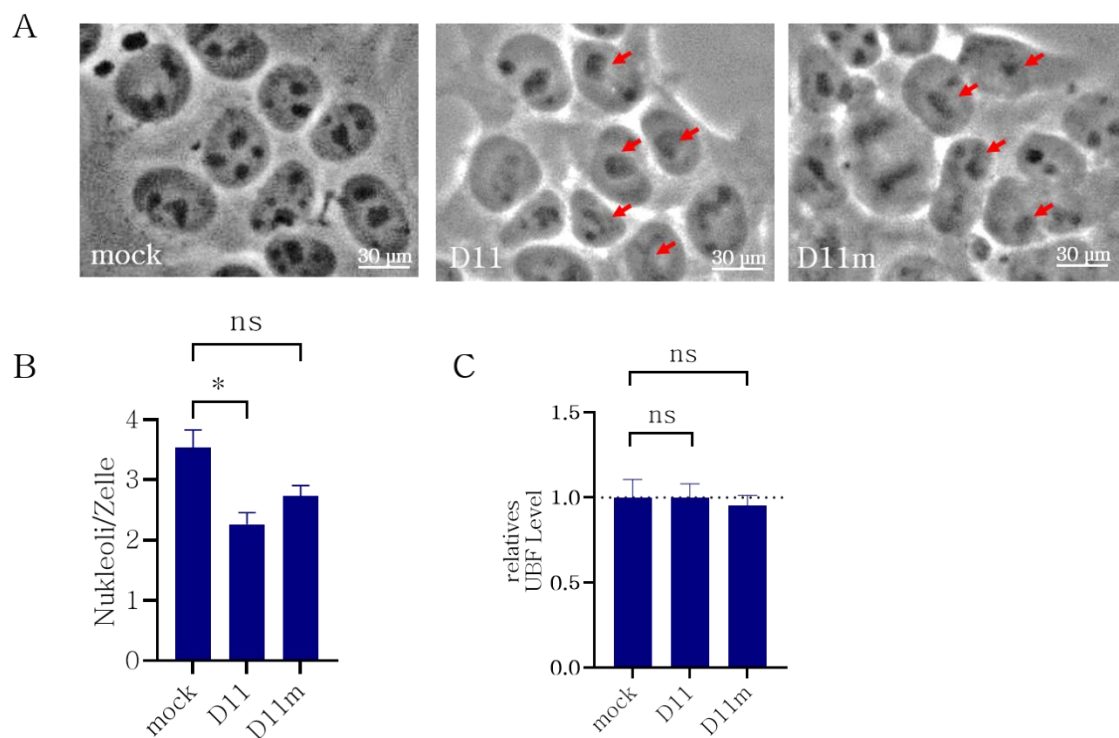


Abb. 3.15 Einfluss von D11 & D11m auf die Nukleolimorphologie. Die Expression der Transgene D11, D11m, sowie der *mock* Kontrolle wurde in den stabilen HEK 293T Zelllinien durch Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 48 h induziert & diese anschließend auf Glasobjektträgern fixiert. **(A)** Die beispielhafte Änderung der Morphologie der Nukleoli im Vergleich zu *mock* wurde durch rote Pfeile markiert. **(B)** Die Quantifizierung der Nukleolizahl pro Zellkern wurde unter dem Phasenlichtmikroskop Observer Z1 von Carl Zeiss durchgeführt. **(C)** Zur Detektion von UBF wurden die Zelllinien in einer 96-*well* Platte mit Glasboden ausgebracht & nach 48 h Induktion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin fixiert. UBF wurde durch Markierung mit einem α -UBF Primär-

antikörper und α -Maus IgG-Alexa Fluor®586 Sekundärantikörper markiert. Zusätzlich wurden die Nuklei mit DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte am Varioskan Flash Plattenlesegerät. Das UBF-Signal wurde anschließend auf DAPI normiert. Als Referenz diente die *mock* Zelllinie, deren Wert auf 1,0 gesetzt wurde. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Bestimmt in Triplikaten (+S.E.M.). Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Im Vergleich zur *mock* Zelllinie, wiesen die Zellen mit D11, bzw. D11m Expression oftmals weniger Nukleoli pro Zelle auf. Zudem sind diese häufig größer und weniger dicht als bei *mock* (Abb. 3.15A). Für die Quantifizierung der Nukleoli der verschiedenen Zelllinien wurden an jeweils drei unterschiedlichen Stellen des Objektträgers acht willkürliche Zellen ausgewählt, von denen die Nukleoli gezählt wurden. Diese wurden addiert und durch die Anzahl der auserwählten Zellen geteilt (Abb. 3.15B). Im Durchschnitt enthielten Zellen der *mock* Zelllinie 3-4 Nukleoli pro Zelle. Bei den D11, bzw. D11m exprimierenden Zellen war die Anzahl mit 2, bzw. 2,5 Nukleoli pro Zelle geringer.

Zusätzlich sollte die nukleoläre Masse insgesamt unter den drei Zelllinien verglichen werden. Dies sollte über die Quantifizierung von UBF, als nukleolärer Marker, erfolgen. Dazu wurden die *mock* Zelllinie, sowie die D11 und D11m exprimierenden 293T Zelllinien in einer 96-*well* Platte mit Glasboden ausgebracht und die Expression der Transgene durch Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und UBF mit einem α -UBF Antikörper und einem fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper markiert. Die Quantifizierung erfolgte am Varioskan Flash Plattenlesegerät von Thermo. Die Werte der Fluoreszenzmessungen wurden anschließend auf die Werte der *mock* Zelllinie bezogen (Abb. 3.15C). Dabei zeigte sich jedoch kein Unterschied.

Durch die mikroskopische Analyse von D11 und D11m exprimierenden 293T Zelllinien konnte im Vergleich zu *mock* gezeigt werden, dass beide Fusionsgene, D11m in einem schwächeren, nicht signifikanten Ausmaß, einen Einfluss auf die Morphologie von Nukleoli ausüben. Sie führen zu einer Reduktion in der Anzahl und Dichte und einer Zunahme in der Größe der Nukleoli. Eine Änderung im UBF Level konnte hingegen nicht festgestellt werden.

3.4.4 Einfluss auf die rRNA Transkription & die ribosomale RNA

In mikroskopischen Lokalisationsstudien und in CoIP Versuchen konnte eine nukleoläre Lokalisation von D11 und D11m, sowie die Interaktion mit SL1, einem Transkriptionsinitiationsfaktor der RNA Polymerase I nachgewiesen

werden (Abb. 3.10 + Abb. 3.11). Im Folgenden sollte der Einfluss, den D11, D11m und auch D4 alleine und in Kombination auf die rRNA Transkription und die ribosomale RNA ausüben, untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Luciferase-Reporter *Assay* generiert, bei dem ein Firefly-Luciferasegen unter der Kontrolle des rRNA Promotors steht. Die messbaren Lichteinheiten, die von der Luciferase generiert werden, korrelieren dabei direkt mit der Aktivität des rRNA Promotors.

3.4.4.1 Generierung des Luciferase-Reportervektors

Zur Messung der rRNA Promotoraktivität musste ein Reportervektor mit einem Luciferasegen unter Kontrolle des rRNA Promotors generiert werden. Dazu wurde mit Hilfe der Starteroligonukleotide pHrRNA.XhoI.f und pHrRNA.r ein 744 bp langer Bereich eines rRNA Promotors aus der genomischen DNA von HEK 293T Zellen amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den Reportervektor pGL3-IRES-Basic vor eine IRES (*internal ribosome entry site*) und ein Firefly-Luciferasegen kloniert (Abb. 3.16).

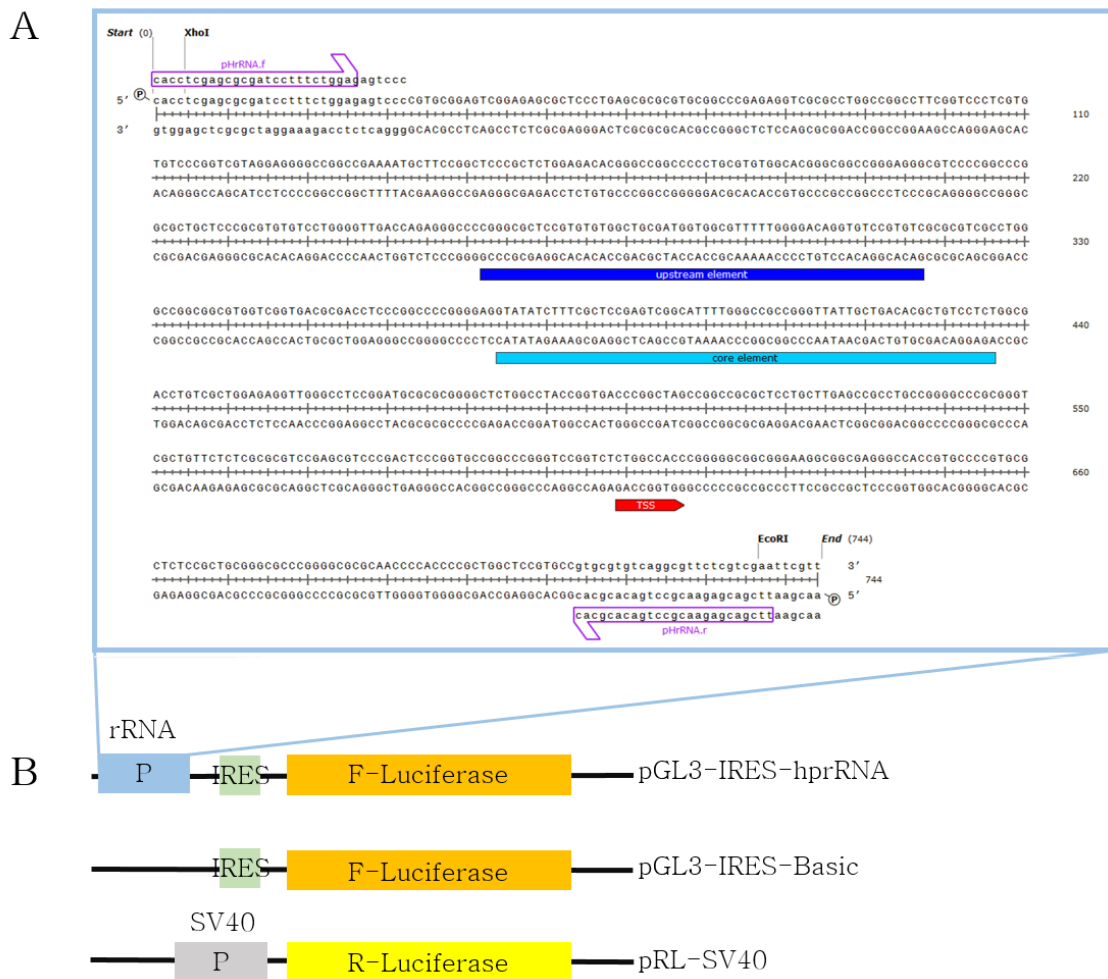


Abb. 3.16 Generierung Luciferase-Reportervektorsystems zur Untersuchung der rRNA Promotoraktivität. (A) Zur Untersuchung der rRNA Promotoraktivität wurde ein 744 bp langes Fragment des rRNA Promotorbereichs unter Verwendung der Starteroligonukleotide pHRNA.f & pHRNA.r (violett) durch PCR amplifiziert. Dieser Bereich enthält die konservierten Motife *upstream element* (UE, blau) & *core element* (CE, türkis), sowie die Transkriptionsstartseite (TSS, rot). (B) Der Promotorbereich wurde in den promotorlosen Luciferase-Reportervektor pGL3-IRES-Basic über *XhoI* & *EcoRI* vor die IRES- Sequenz zur Generierung des Vektors pGL3-IRES-hprRNA kloniert. Dessen F-Luciferase stand fortan unter Kontrolle des rRNA Promotors. Der Vektor pGL3-IRES-Basic diente als Kontrolle & der Vektor pRL-SV40 diente mit einer konstitutiv exprimierten R-Luciferase als interner Standard. P, Promotor; IRES, *Internal Ribosome Entry Site*; SV40-P, konstitutiver *early* SV40-Promotor; F, Firefly; R, Renilla

Der neu generierte Reportervektor wird fortan pGL3-IRES-hprRNA genannt. Der integrierte Promotorbereich wurde so gewählt, dass die beiden konservierten Motife UP (*upstream element*) und CE (*core element*), sowie die TSS (Transkriptionsstartseite) enthalten sind. Auf Grund der variablen

Bereiche die verschiedene rRNA Promotoren aufweisen können, wurde der gewählte Promotorbereich ebenfalls sequenziert (Abb. 3.16A). Als Negativkontrolle, ohne rRNA Promotor, wurde der Ausgangsvektor pGL3-IRES-Basic verwendet. Als interner Standard diente das Plasmid pRL-SV40, welches ein Renilla-Luciferasegen unter Kontrolle des konstitutiven *early* SV40-Promotors enthält (Abb. 3.16B).

3.4.4.2 Überprüfung der RNA Polymerase I abhängigen Transkription von pGL3-IRES-hprRNA

Vor der Untersuchung des Einflusses der t(4;11) Transgene auf die rRNA Promotoraktivität sollte zunächst überprüft werden, ob die mit Hilfe des neu generierten Reportervektors pGL3-IRES-hprRNA gemessene Luciferaseaktivität auch ausschließlich auf die Aktivität der Pol I zurückzuführen ist. Dazu wurde die HEK 293T *mock* Zelllinie nach der transienten Transfektion der Luciferase-Reportervektoren für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Aktinomycin D (Akt D), einem Inhibitor der Pol I-Aktivität, inkubiert und die Luciferaseaktivitäten anschließend am Varioskan Flash Plattenlesegerät von Thermo gemessen (Abb. 3.17).

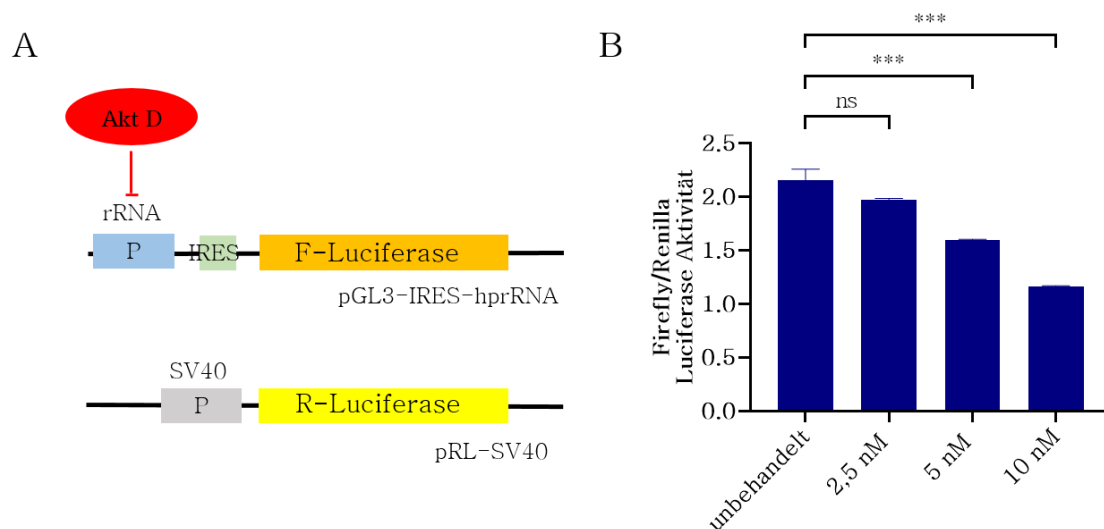


Abb. 3.17 Überprüfung der RNA Polymerase I abhängigen Transkription des Luciferasegens des Vektors pGL3-IRES-hprRNA. Die stabile HEK 293T *mock* Zelllinie wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin, sowie für 24 h mit und ohne verschiedener Konzentrationen an Akt D behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen 24 h vor dem *Assay* transient mit den Luciferasevektoren pGL3-IRES-hprRNA & pRL-SV40 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert & die Aktivitäten der verschiedenen Luciferasen gemessen. **(A)** Akt D fungiert als Pol I-Inhibitor, der im generierten Luciferase-Reportersystem die Pol I-abhängige Transkription der F-Luciferase des pGL3-IRES-hprRNA Vektors inhibiert, während die Pol II-abhängige Transkription der R-Luciferase des pRL-SV40 Vektors unbeeinflusst bleibt. **(B)** Analyse der Beeinträchtigung der Pol I abhängigen Transkription der F-Luciferase durch Akt D. Bildung

des Quotienten aus Firefly- (F-) & Renilla (R-) Luciferase Aktivität. Gemessen in Triplikaten (+S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. Akt D, Aktinomycin D; P, Promotor; IRES, *Internal Ribosome Entry Site*; SV40-P, konstitutiver *early* SV40-Promotor; F, Firefly; R, Renilla

Akt D interkaliert in GC reiche DNA, wie sie vor allem in den rDNA Einheiten vorkommt und hemmt deshalb spezifisch die Transkription der RNA Polymerase I. Dem zufolge müsste die Pol I abhängige Transkription des Firefly-Luciferasegens unter Kontrolle des rRNA Promotors von pGL3-IRES-hprRNA durch eine Akt D Behandlung abnehmen, während die Pol II abhängige Transkription des Renilla-Luciferasegens von pRL-SV40 unbeeinflusst bleibt (Abb. 3.17A). Das Verhältnis der Firefly-Aktivität zur Renilla-Aktivität müsste sich demnach unter Akt D Behandlung reduzieren. Das Verhältnis von Firefly/Renilla bei unbehandelter *mock* Zellen lag bei 2,2. Mit steigender Akt D Konzentration reduzierte es sich auf 2 bei 2,5 nM, 1,6 bei 5 nM bis hin zu 1,3 bei 10 nM Akt D Behandlung für 24 h. Die Pol I abhängige Transkription des Firefly-Luciferasegens von pGL3-IRES-hprRNA gilt somit als bewiesen und im Folgenden kann dieses zur Untersuchung des Einflusses der t(4;11) Transgene auf die rRNA Promotoraktivität eingesetzt werden.

3.4.4.3 Einfluss der t(4;11) Transgene auf die rRNA Promotoraktivität

Nach der Generierung und Überprüfung des Luciferase-Reportervektors pGL3-IRES-hprRNA zur Quantifizierung der rRNA Promotoraktivität sollte anschließend der Einfluss der t(4;11) Transgene auf diese untersucht werden. Um weiterhin zu überprüfen ob dabei die Interaktion zwischen D11 und D11m mit dem SL1 Komplex eine Rolle spielen könnte, wurden die stabilen transgen-exprimierenden HEK 293T Zelllinien, zusätzlich zu den Luciferase-Reportervektoren, transient mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transfiziert. Die Expression der

Transgene erfolgte durch Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 48 h und die transiente Transfektion erfolgte 24 h vor dem *Assay*.

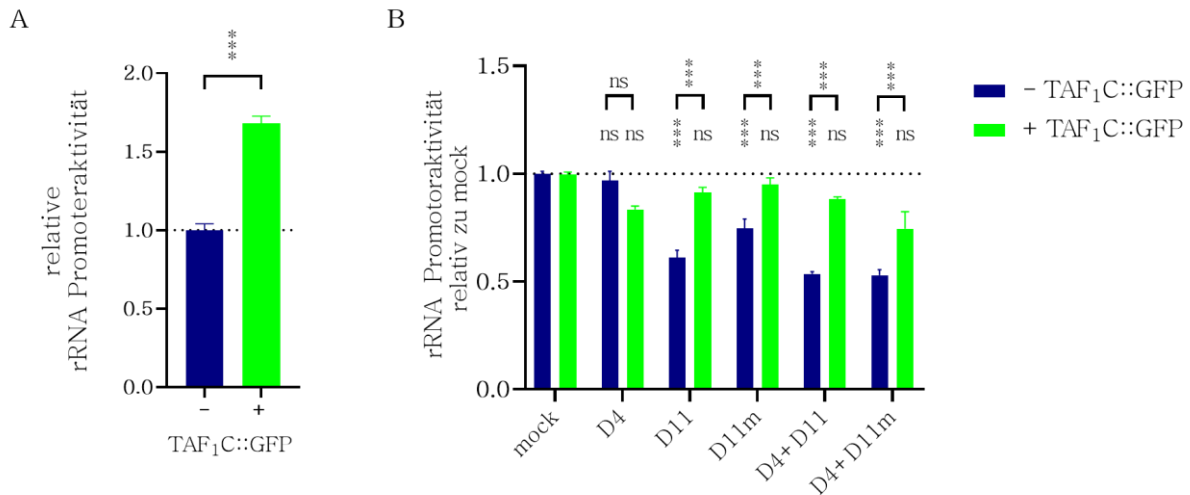


Abb. 3.18 Messung der rRNA Promotoraktivität in t(4;11) exprimierenden Zellen. Die Expression der Transgene wurde in den sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Zusätzlich wurden die Zellen 24 h vor dem *Assay* transient mit den Luciferasevektoren pGL3-IRES-Basic, bzw. pGL3-IRES-hprRNA & pRL-SV40, sowie ggf. mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert & die Aktivitäten der verschiedenen Luciferasen gemessen. Die Analyse erfolgte durch Normierung auf pRL-SV40pA & wurde anschließend in Bezug zu *mock* (=1) gesetzt. **(A)** Einfluss von TAF₁C::GFP auf die rRNA Promotoraktivität. **(B)** Einfluss der t(4;11) Transgene auf die rRNA Promotoraktivität in Anwesenheit & Abwesenheit von TAF₁C::GFP. Gemessen in Triplikaten (+S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Als erstes wurde untersucht, welchen Einfluss die transiente Transfektion von TAF₁C::GFP allein auf die rRNA Promotoraktivität ausübt. Dazu wurde die *mock* Zelllinie mit den Luciferase-Reportervektoren allein, sowie in Kombination mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transient transfiziert und die Luciferaseaktivitäten nach 24 h gemessen (Abb. 3.18A). Zu sehen war eine um 60 % gesteigerte Promotoraktivität wenn TAF₁C::GFP überexprimiert wurde. Beim Vergleich der t(4;11) transgenexprimierenden Zelllinien zeigte sich eine bis zu 50 % reduzierte rRNA Promotoraktivität in Anwesenheit der Transgene D11, D11m und der co-transfizierten Zelllinien D4+D11 und D4+D11m. Die D4-Zelllinie zeigte hingegen keinerlei Veränderung in ihrer Promotoraktivität (Abb. 3.18B). Bei der zusätzlichen Expression von TAF₁C::GFP in den t(4;11) transgenexprimierenden Zelllinien konnte hingegen keine Reduktion der rRNA

Promotoraktivität festgestellt werden. TAF₁C::GFP scheint den inhibierenden Effekt von D11 und D11m auf die rRNA Promotoraktivität zu kompensieren.

3.4.4.4 Einfluss der t(4;11) Transgene auf die rRNA Expression und die rDNA

Nachdem für den rRNA Promotor eine D11/D11m abhängige Reduktion der Aktivität gezeigt werden konnte, welche durch Überexpression von TAF₁C::GFP kompensiert werden konnte (Abb. 3.18), sollte im Folgenden zum einen die Transkriptmenge der rRNA und zum anderen die Anzahl aktiver rRNA Gene quantifiziert werden (Abb. 3.19). Die Quantifizierung der rRNA erfolgte nach RNA Isolation und cDNA Synthese aus t(4;11) exprimierenden HEK 293T Zellen nach 48 h Induktion der Transgenexpression mit 1 µg/ml Doxycyclin. Die Menge an rRNA wurde mit Hilfe der qPCR und den Starteroligonukleotiden 28S.F und 3'ETS.R gemessen. Da das Prä-rRNA Transkript nach der Transkription einer Reihe von Prozessierungsschritten unterliegt, wurden die Starteroligonukleotide so gewählt, dass ausschließlich noch unprozessiertes Transkript gemessen werden konnte. Zur Quantifizierung der aktiven rDNA Kopien wurde das Proteinlevel von UBF, welches mit der Anzahl transkribierbarer rDNA-Einheiten korreliert, durch einen α-UBF Antikörper und einen fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper markiert und anschließend am Varioskan Flash Plattenlesegerät detektiert. Vor der Antikörperinkubation wurden die t(4;11) exprimierenden HEK 293T Zellen nach 48 h Induktion der Transgene in einer 96-*well* Zellkulturplatte mit Glasboden fixiert und permeabilisiert.

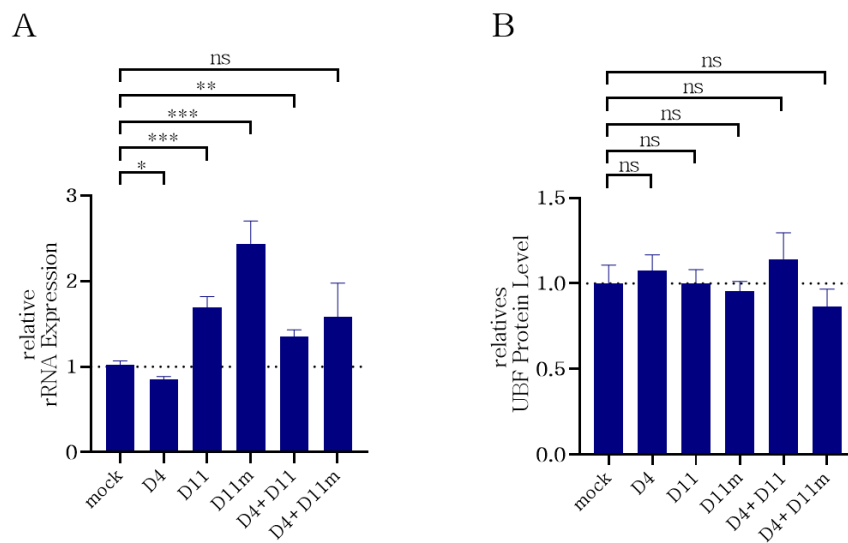


Abb. 3.19 Quantifizierung des Prä-rRNA Transkriptes & der aktiven rDNA.

Die Expression der stabilen t(4;11) Transgene in HEK 293T Zellen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. **(A)** Nach erfolgter RNA Isolation & cDNA Synthese wurde die Expression des 47 S Prä-rRNA Transkriptes durch qPCR überprüft. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Als Referenz diente die *mock* Zelllinie, deren normierte Expression auf 1,0 gesetzt wurde. Die Analyse erfolgte durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. **(B)** Zur Detektion von UBF, als Marker aktiv zu transkribierenden rDNA-Einheiten, wurden die Zelllinien in einer 96-*well* Platte mit Glasboden ausgebracht & nach 48 h Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin fixiert. UBF wurde durch Markierung mit einem α -UBF Primärantikörper und α -Maus IgG-Alexa Fluor®586 Sekundärantikörper markiert. Zusätzlich wurden die Nuklei mit DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte am Varioskan Flash Plattenlesegerät. Das UBF-Signal wurde anschließend auf DAPI normiert. Als Referenz diente die *mock* Zelllinie, deren Wert auf 1,0 gesetzt wurde. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (n=3; +S.E.M.).

Die Expression der rRNA wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ Methode bestimmt. Als Haushaltsgen diente *GAPDH*. Während D4 exprimierende Zellen eine minimale Reduktion der rRNA Expression zeigten, konnte bei D11 eine um das 1,8 fach und bei D11m eine um das 2,2 fach erhöhte Expression der rRNA beobachtet werden. Bei den co-transfizierten Zelllinien zeigte sich hingegen eine geringere Erhöhung der Expression um das 1,25 und 1,45 fache.

Das UBF Level, als Marker für aktiv zu transkribierende rDNA Einheiten, wurde durch Immunfärbung mit einem α -UBF Antikörper und fluoreszierendem Sekundärantikörper, auf die Zellzahl durch Anfärben der Nuklei mit DAPI normiert. Es wurde dabei kein, durch die t(4;11) Transgene, beeinflusstes UBF Level detektiert.

3.4.5 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Ribosomen

Im Vorangegangenen wurde der Einfluss der t(4;11) Transgene auf den Prozess der rRNA Transkription, als frühen Schritt der RiBi untersucht (Abb. 3.18). Daran anschließend sollten nun die final prozessierten rRNA Spezies 18S und 28S, als Komponenten der 40S und 60S Untereinheiten des 80S Ribosoms, sowie die Menge an Ribosomen und auch aktiv translatierenden Polysomen in den verschiedenen t(4;11) exprimierenden Zelllinien quantifiziert werden.

3.4.5.1 Einfluss auf die ribosomalen RNA Spezies

Zur Überprüfung der 18S und 28S rRNA Spezies wurden die Expression der t(4;11) Transgene in den verschiedenen stabilen HEK 293T Zelllinien für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert und anschließend die Gesamt RNA isoliert. Diese wurde auf der Tape Station 2200 von Agilent aufgetrennt und detektiert (Abb. 3.20).

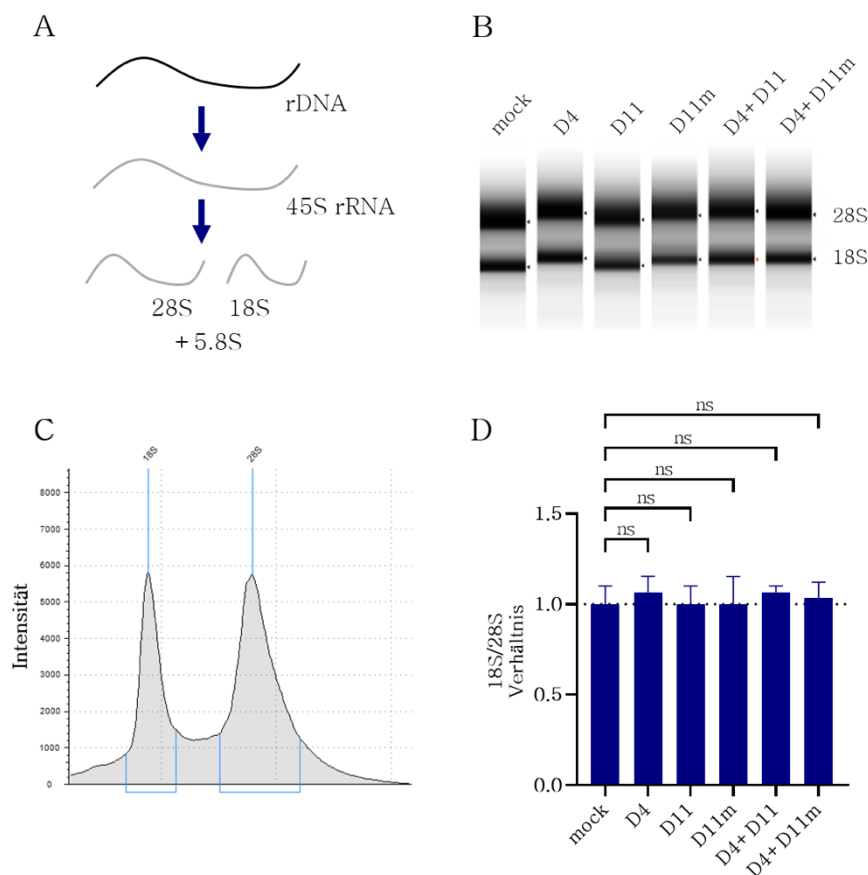


Abb. 3.20 Überprüfung des Einflusses von t(4;11) Fusionsproteinen auf die 18S & 28S rRNA. Die Expression der t(4;11) Transgene in den sechs stabilen HEK 293T Zelllinien wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert & anschließend RNA isoliert. **(A)** Schema der rRNA Prozessierung. Transkription des rRNA Gens generiert das 47S Prä-rRNA Transkript,

welches in mehreren Schritten in die reifen rRNA Spezies 28S, 18S & 5,8S prozessiert wird. **(B)** Auftrennung der 28S & 18S rRNA im RNA Screen Tape. **(C)** Quantifizierung der Intensität von 28S & 18S rRNA mit Hilfe der Agilent Tape Station 2200. Hier beispielhaft gezeigt für *mock*. **(D)** Darstellung des 18S/28S Verhältnisses der t(4;11) transgenexprimierenden Zellen in Bezug zu *mock* (=1). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem unpaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (n=3; + S.E.M.).

Aus der Transkription der rDNA entsteht das 47S rRNA Prä-Transkript, welches über mehrere Prozessierungsschritte in je eine 28S, eine 18S und eine 5,8S rRNA Spezies geteilt wird (Abb. 3.20A). Da die rRNA die Mehrheit der RNA einer Zelle ausmacht sind 18S und 28S rRNA in der Gelelektrophorese gut detektierbar und die jeweiligen Intensitäten können quantifiziert werden (Abb. 3.20B+C). Bei einer korrekt ablaufenden rRNA Prozessierung ergibt sich ein Verhältnis von 18S zu 28S von 1. Eine signifikante Abweichung des Verhältnisses von 18S/28S konnte bei keine der untersuchten t(4;11) Zelllinien beobachtet werden (Abb. 3.20D).

3.4.5.2 Einfluss auf die ribosomalen Untereinheiten & Polysomen

Mit Hilfe der Saccharosedichtegradientenzentrifugation können ribosomale Untereinheiten, Ribosomen und Polysomen aufgetrennt und über Messung der integrierten rRNA Komponenten bei 254 nm detektiert werden. Eine Quantifizierung wird durch Bestimmung der jeweiligen Flächen unterhalb der Absorptionsmaxima ermöglicht. Dazu wurden t(4;11) transgenexprimierenden stabilen HEK 293T Zelllinien für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert und daraufhin lysiert. Anschließend wurden 25 Absorptionseinheiten (OD_{254}) an Zellysate auf einen 10-50 %igen Saccharosedichtegradienten aufgeladen und dann ultrazentrifugiert. Dabei wandern ribosomale Untereinheiten, Ribosomen und Polysomen entsprechend ihrer Dichte unterschiedlich weit in den Gradienten hinein. Nach der Zentrifugation erfolgte das Auslesen des Gradienten über Messung der Absorption (OD_{254} , Abb. 3.21).

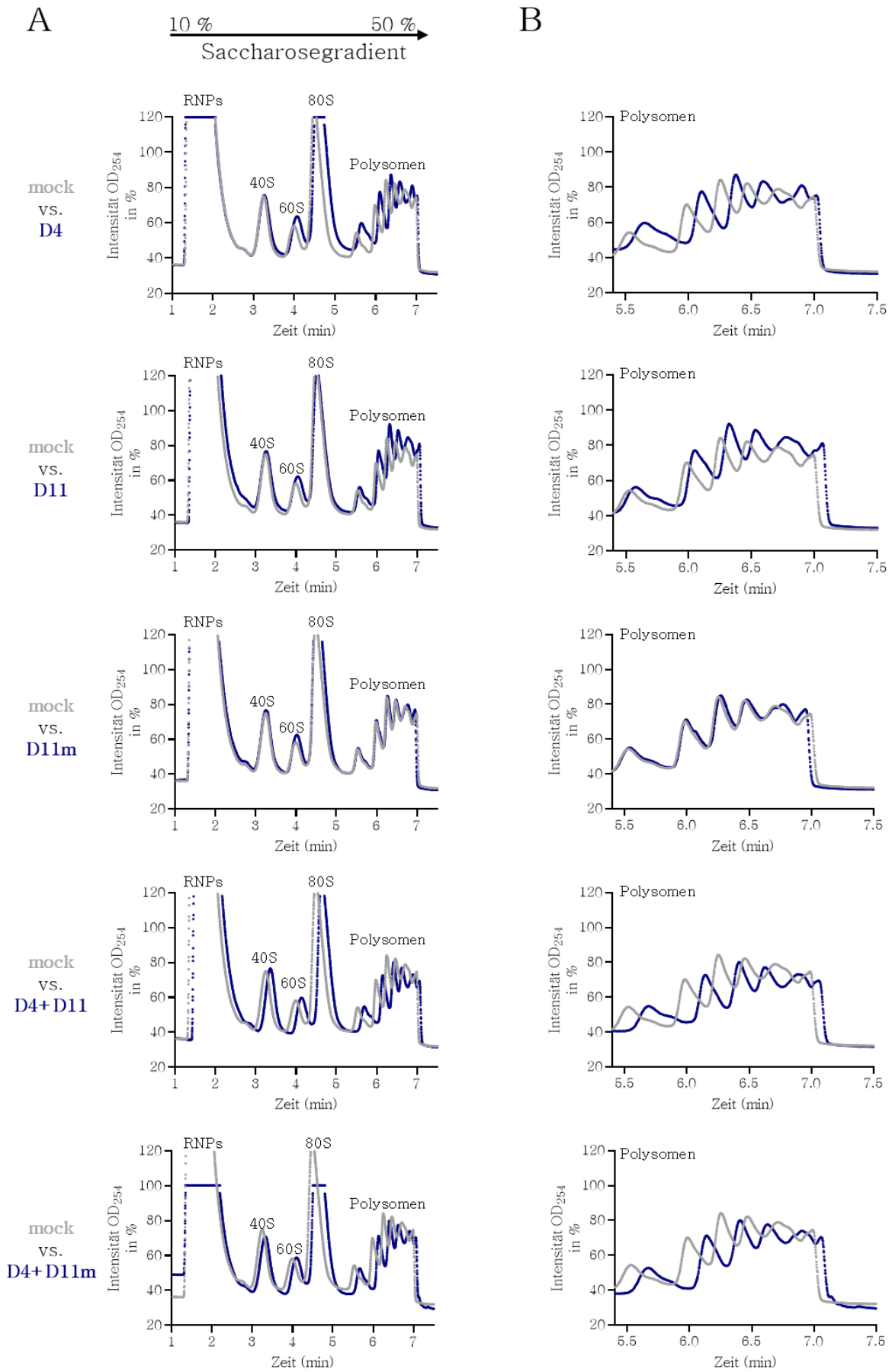


Abb. 3.21 Einfluss der t(4;11) Transproteine auf das Polysomenprofil. Die Expression der t(4;11) Transgene in den sechs stabilen HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert & das Proteinlysate über Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Analyse des Gradienten erfolgte durch OD₂₅₄ Bestimmung. **(A)** Darstellung des gesamten Gradientenprofils. **(B)** Darstellung der Polysomenfraktionen. (n=2).

Das Auslesen eines Saccharosedichtegradienten betrug etwa 7 bis 8 Minuten. Zu Beginn, nach 1 bis 2 Minuten, konnte ein großer *Peak* aus diffusen kleinen RNA Spezies und Ribonukleoproteinen detektiert werden. Nach etwa 3 Minuten erschien ein *Peak* für die 40S Untereinheiten (18S rRNA), gefolgt von einem *Peak* für die 60S Untereinheit (28S rRNA) nach 4 Minuten und einem weiteren *Peak* mit vollständigen 80S Ribosomen bei etwa 5 Minuten. Daran anschließend zwischen 5,5 und 7 Minuten waren mehrere schmale *Peaks*, welche Polysomen repräsentieren, detektierbar. Sie bestanden aus 5 bis 6 Einzel-*Peaks* und setzen sich aus jeweils + 1 Ribosom pro mRNA zusammen. Aus den erhaltenen Profilen sollte im Anschluss zum einen das Verhältnis der beiden ribosomalen Untereinheiten zueinander, sowie der Anteil an Polysomen als aktiv translatierende Ribosomen bestimmt und auf die *mock* Zelllinie bezogen werden (Abb. 3.22).

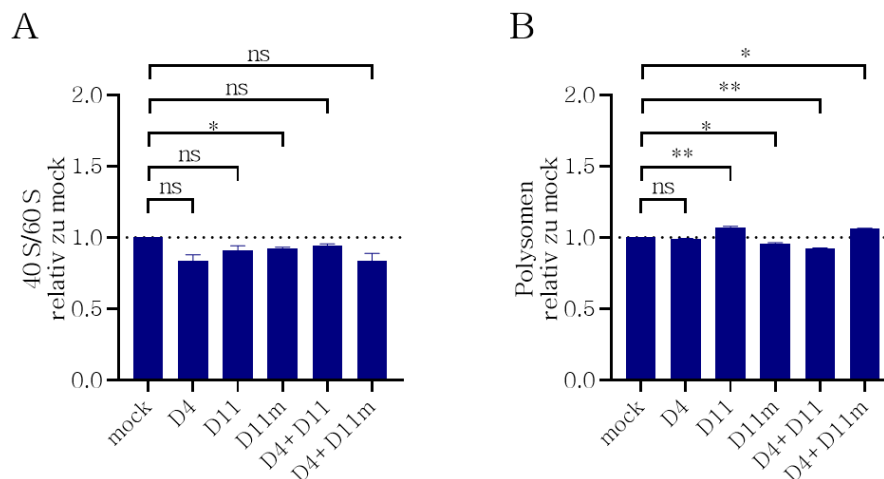


Abb. 3.22 Quantifizierung der ribosomalen Einheiten unter Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine. Die Expression der t(4;11) Transgene in den sechs stabilen HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert & das Protein-lysate über Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Analyse des Gradienten erfolgte durch OD₂₅₄ Bestimmung. Zur Quantifizierung wurden die Flächen der RNA-Peak bestimmt (n=2). **(A)** Das Verhältnis aus 40S/60S wurde auf die *mock* Zelllinie bezogen (=1). **(B)** Die Polysomenfläche wurde auf die der *mock* Zelllinie bezogen (=1). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte

beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (n=3; + S.E.M.).

Dabei zeigten sich für das Verhältnis von 40S zu 60S Untereinheit nur minimale Reduktionen, welche ausschließlich bei den D11m exprimierenden Zellen schwach signifikant waren. Auch bei der Quantifizierung der Polysomen waren die Unterschiede zur *mock* Zelllinie nur marginal. Während bei D4 exprimierenden Zellen kein Unterschied messbar war, konnte für D11 und D4+D11m eine leichte Erhöhung und für D11m und D4+D11 eine schwache Erniedrigung der Menge an Polysomen gemessen werden.

3.5 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Proteintranslation

Nach den Untersuchungen zur RiBi und dem Ribosomengehalt während der Expression der t(4;11) Transgene von HEK 293T Zellen sollte nun der Einfluss auf die Proteinbiosynthese betrachtet werden. Dazu wurde das „*Click-iT™ HPG Alexa Fluor™ 594 Protein Synthesis Assay*“ Kit von Invitrogen verwendet. Dieses detektiert neu synthetisierte Proteine durch Einlagerung des fluoreszenzkoppelbaren Methioninanalogs HPG innerhalb einer definierten Zeit von 30 Minuten (Abb. 3.23A). Zusätzlich sollte auch hier überprüft werden, ob die Interaktion zwischen D11 und D11m mit dem SL1 Komplex eine Rolle spielt. Dazu wurden die stabilen t(4;11) transgenexprimierenden HEK 293T Zelllinien zusätzlich transient mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transfiziert. Die Expression der Transgene erfolgte durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h und die transiente Transfektion von pSBtet_TAF₁C::GFP_B erfolgte 24 h vor dem Assay.

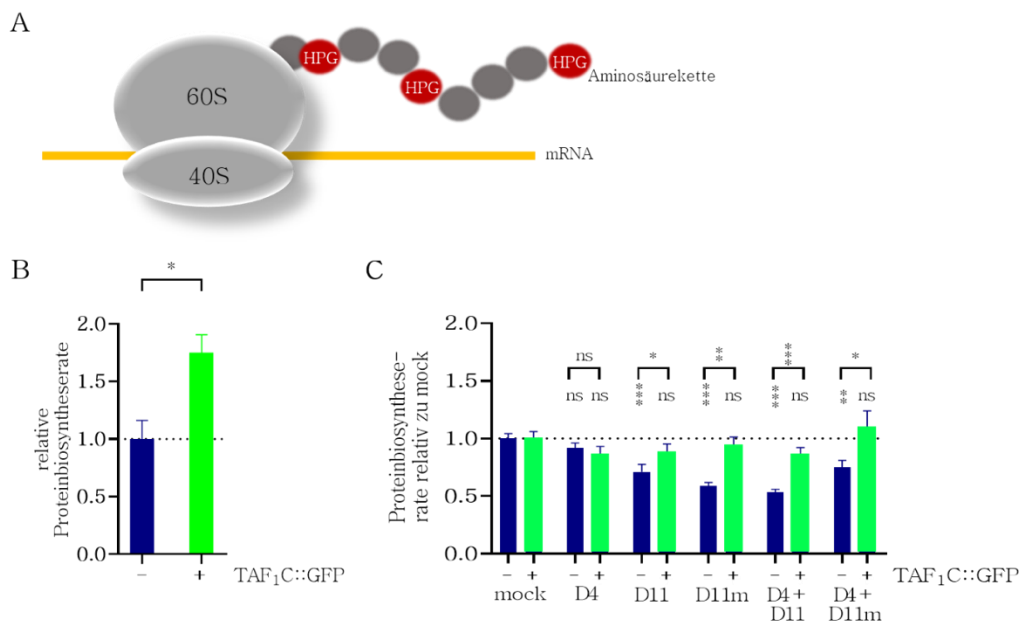


Abb. 3.23 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Proteinsynthese. Die Expression der Transgene wurde in den sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien für 48 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin induziert. Zusätzlich wurden die Zellen 24 h vor dem Assay ggf. transient mit pSBtet_TAF₁C::GFP_B transfiziert. Anschließend wurde die Proteinsyntheserate ermittelt. Die Analyse erfolgte durch Normierung auf *mock* (=1). **(A)** Prinzip des „Click-iT™ HPG Alexa Fluor™ 594 Protein Synthesis Assay“ Kits: In methionin-freiem Medium wird über einen Zeitraum von 30 Minuten HPG anstelle von Methionin in neu synthetisierte Proteine eingebaut. **(B)** Einfluss von TAF₁C::GFP auf die Proteinsynthese. (n=3) **(C)** Einfluss der t(4;11) Transgene auf die Proteinsynthese in Anwesenheit und Abwesenheit von TAF₁C::GFP (n=4). Gemessen in Hexaplikaten (+ S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die transiente Transfektion von TAF₁C::GFP allein auf die Proteinbiosynthese ausübt (Abb. 3.23B). Dazu wurde die *mock* Zelllinie, mit und ohne transiente pSBtet_TAF₁C::GFP_B Transfektion, nach 48 h Induktion mit 1 μ g/ml Doxycyclin im Proteinsynthese Assay gemessen (Abb. 3.23B). Dabei zeigte sich eine bis zu 70 %ige Steigerung der Proteinsyntheserate. Der Vergleich der t(4;11) transgenexprimierenden Zelllinien ohne TAF₁C::GFP Expression zeigte eine bis zu 50 % reduzierte Proteintranslation in Anwesenheit der Transgene D11, D11m und der co-transfizierten Zelllinien D4+D11 und D4+D11m (Abb. 3.23C). Die D4-Zelllinie zeigte im Vergleich zu *mock* keinerlei Änderung. Bei einer Überexpression von TAF₁C::GFP hingegen konnte keine entsprechende Reduktion Proteinsynthese detektiert werden. TAF₁C::GFP scheint den inhibierenden Effekt von D11 und D11m auf die Proteinbiosynthese zu kompensieren.

3.6 Studien zum Energiehaushalts & Metabolismus in Abhängigkeit der t(4;11) Fusionsproteine

Nachdem in vorangegangenen Kapiteln sowohl der Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die RiBi, als auch auf die Proteintranslation untersucht wurde, sollte im Folgendem der Einfluss auf das Zellwachstum und den Energiemetabolismus untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Expression der Transgene in den stabilen HEK 293T Zelllinien, durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin, für 48 h induziert.

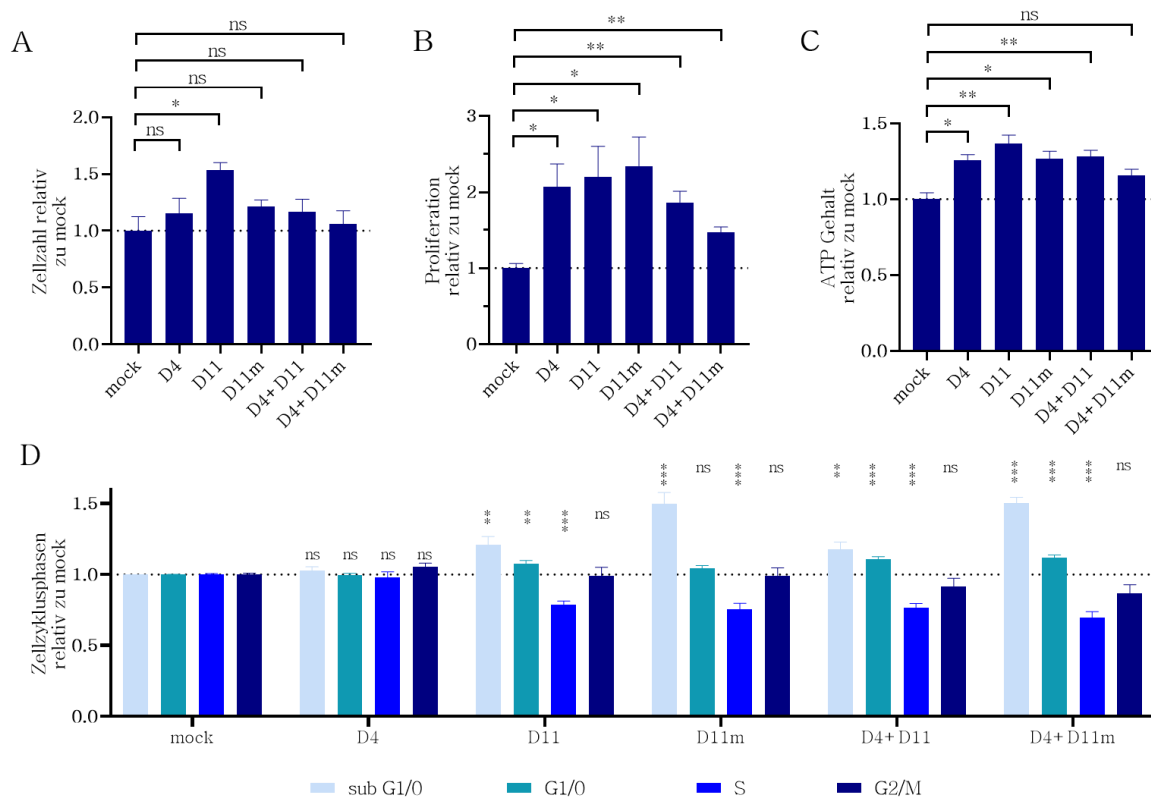


Abb. 3.24 Studien zum Zellwachstum & dem Energiemetabolismus. Die Expression der Transgene wurde für 48 h in den sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. **(A)** Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Zellzählung am Nucleocounter NC-3000™ mit Hilfe des Programms „Viability and Cell Count using NC-Slides™ – Mammalian Cells“ in Relation zu mock. (n=3) **(B)** Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte unter Verwendung des „CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays“ in Relation zu mock. (n=3) **(C)** Die indirekte Bestimmung des ATP Gehalts erfolgte mittels des „CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ in Relation zu mock. (n=3) **(D)** Die Zellzyklusphasenanalyse wurde mit Hilfe des Nucleocounter NC-3000™ mit dem Programm „Two-step cell cycle analysis“ in Relation zu mock durchgeführt. (n=6; + S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am Nucleocounter NC-3000™ unter Nutzung des Programms „*Viability and Cell Count using NC-Slides™ – Mammalian Cells*“ (Abb. 3.24A). Dazu wurden je 1×10^6 Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgebracht, induziert und die Zellzahl nach 48 h Inkubation gemessen. Die ermittelten Zellzahlen wurden auf die Werte der *mock* Zelllinien normiert. Es zeigte sich nur bei D11 exprimierenden Zellen eine signifikante Erhöhung der Zellzahl um 50 %. Für alle anderen Zelllinien waren hingegen keine signifikanten Änderungen der Zellzahl zu beobachten.

Mit Hilfe des „*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays*“ von Promega wurde die Proliferation der transgenexprimierenden Zelllinien untersucht. Die Proliferation wurde dabei über die Menge der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, welche von Dehydrogenase Enzymen im Metabolismus der Zellen produziert werden, gemessen (Abb. 3.24B). Im Vergleich mit der *mock* Zelllinien konnte für alle t(4;11) transgenexprimierenden Zelllinien eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden. Diese war für die einzel-transgenexprimierenden Zellen um bis zu 2,2 fach erhöht. Bei den co-transfizierten Zelllinien D4+ D11 und D4+ D11m zeigte sich eine Proliferationssteigerung um das 1,7, bzw. 1,5 fache.

Der Energiegehalt der verschiedenen Zelllinien wurde anhand des Levels an ATP über das „*CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*“ von Promega bestimmt (Abb. 3.24C). Dabei handelt es sich um eine indirekte Quantifizierung von ATP über die Messung des von einer Luciferase produzierten Lichts, welches direkt mit der Menge an ATP korreliert. Dabei zeigte sich, verglichen mit der *mock* Zelllinie eine leichte Steigerung bei allen fusionsgenexprimierenden Zellen um bis zu 1,35. Für D4+ D11m exprimierende Zellen war diese jedoch nicht signifikant.

Zusätzlich wurde für alle transgenexprimierenden Zelllinien eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dies erfolgte am Nucleocounter NC-3000™ mit dem Programm „*Two-step cell cycle analysis*“ durch die fluorometrische Messung der DAPI markierten DNA der Zellpopulationen. Die gemessenen Werte der einzelnen Zellzyklusphasen wurden anschließend auf die Werte der *mock* Zelllinie normiert (Abb. 3.24D). Für D4 exprimierende Zellen zeigte sich keine anteilige Änderung der Zellzyklusphasen verglichen mit *mock*. Für D11 und D11m, sowie die co-exprimierenden Zelllinien konnte eine Steigerung der sub G1/0 Population festgestellt werden. Diese betrug ca. 1,2 bei den D11 und D4+ D11 Zelllinien, sowie ca. 1,5 bei den Zelllinien mit D11m und D4+ D11m. Bei diesen vier Zelllinien konnte des Weiteren eine Erniedrigung der S-Phasenpopulation, verglichen mit *mock* um den Faktor 0,8, beobachtet werden.

3.7 Interaktion der t(4;11) Fusionsproteine mit dem Wnt Signalweg

3.7.1 Überprüfung des p53 Proteinlevels

Die Beeinträchtigung der RiBi kann zur p53-abhängigen Apoptose führen. Da in Kapitel 3.4.4.3 und 3.5 eine Reduktion der rRNA Promotoraktivität, sowie eine Reduktion der Proteintranslation unter Expression von D11/D11m beobachtet werden konnte, sollte nun das Proteinlevel von p53 in t(4;11) transgen-exprimierenden HEK 293T Zellen untersucht werden.

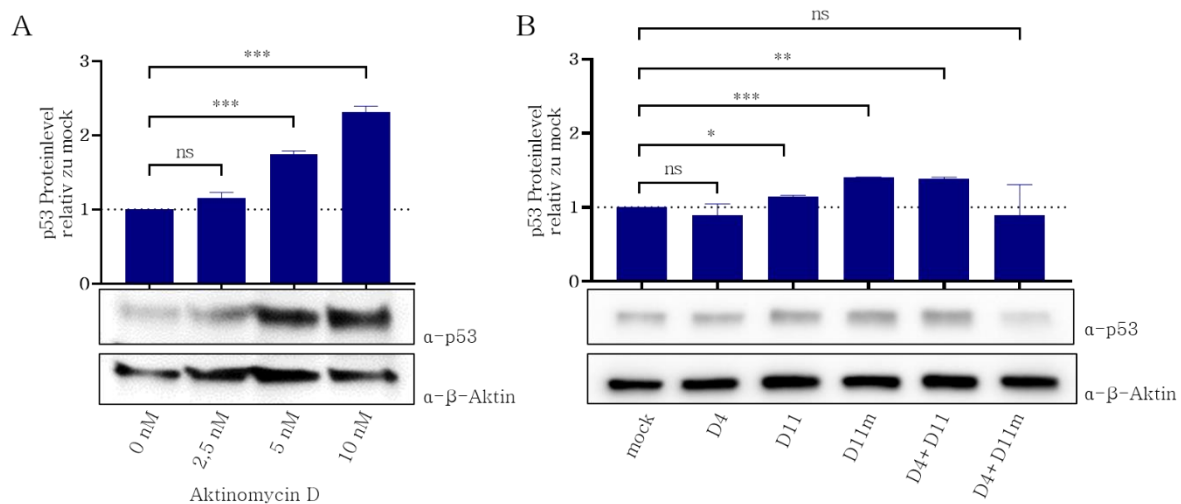


Abb. 3.25 Beeinflussung des p53 Proteinlevels. Die Expression der Transgene in den sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert & die Zellen anschließend lysiert. Zur Western Blot Analyse wurden anschließend 10 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt & auf eine PVDF Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Primärantikörper und HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Die Detektion von β-Aktin diente als Ladekontrolle. **(A)** Zur Analyse des Einflusses von Akt D auf das p53 Proteinlevel wurde die *mock* Zelllinie 24 h vor der Lyse mit verschiedenen Konzentrationen an Akt D behandelt. **(B)** Analyse des p53 Levels in Anwesenheit der verschiedenen t(4;11) Fusionsproteine. (n=3; +S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Zunächst sollte die Akkumulation von p53 unter nukleolärem Stress bestätigt werden (Abb. 3.25A). Dazu wurden Zellen der *mock* Zelllinie für 24 h mit verschiedenen Konzentration an Akt D, einem Pol⁻-Transkriptionsinhibitor, inkubiert. Nach der Zellyse wurden 10 µg des Proteinlysats mittels SDS-PAGE auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgeladen und bei 20 mA aufgetrennt. Das p53 Proteinlevel wurde anschließend im Western Blot mit einem α-p53 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Aktin. Es zeigte sich,

dass ab einer Akt D Konzentration von 5 nM ein signifikanter Anstieg des p53 Levels zu beobachten war. Dieser betrug bei 5 nM Akt D das 1,7 fache und bei 10 nM das 2,2 fache. Beim Vergleich der verschiedenen t(4;11) transgen-exprimierenden, stabilen Zelllinien, zeigte sich nach 48 stündiger Induktion der Transgene mit 1 µg/ml Doxycyclin, eine schwache Akkumulation von p53 bei D11, D11m und D4+D11 exprimierenden Zellen von 1,1, bzw. 1,3.

3.7.2 Überprüfung des β -Catenin Proteinlevels

Über den kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg können Zellen unter nukleolärem Stress einer Apoptoseinduktion entkommen. Dies wird durch Akkumulation von β -Catenin und der daraus resultierenden Aktivierung von anti-apoptotischen Genen ermöglicht. Um zu überprüfen, ob der Wnt/ β -Catenin Signalweg auch bei der Beeinflussung der RiBi durch D11/D11m eine Rolle spielt sollte im Folgenden das β -Cateninproteinlevel in t(4;11) fusionsgen-exprimierenden HEK 293T Zellen untersucht werden.

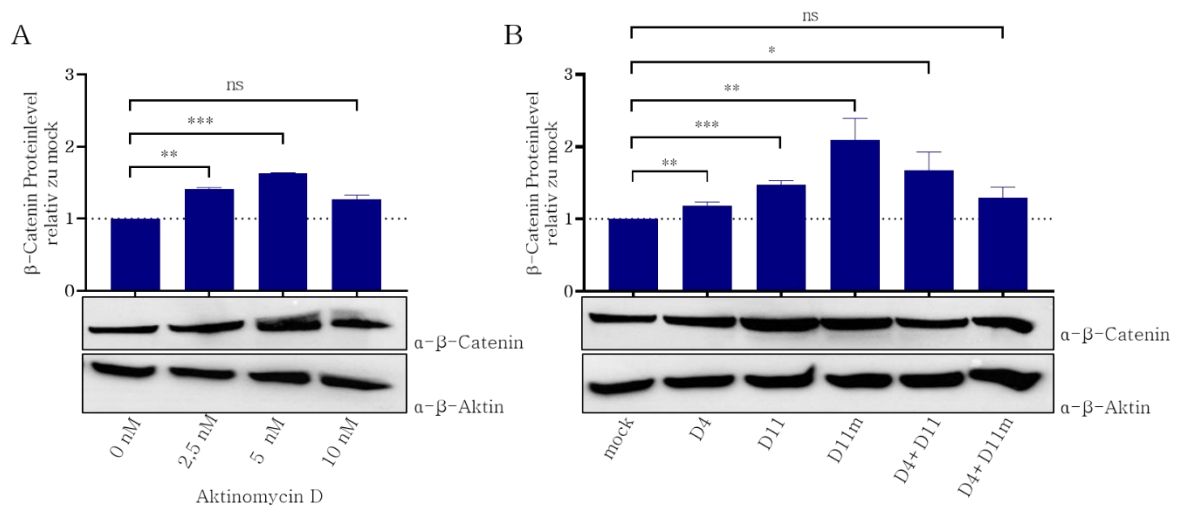


Abb. 3.26 Beeinflussung des β -Catenin Proteinlevels. Die Expression der Transgene in den sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert & die Zellen anschließend lysiert. Zur Western Blot Analyse wurden das Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt & auf eine PVDF Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Primärantikörper und HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Die Detektion von β -Aktin diente als Ladekontrolle. **(A)** Zur Analyse des Einflusses von Akt D auf das β -Catenin Proteinlevel wurde die *mock* Zelllinie 24 h vor der Lyse mit verschiedenen Konzentrationen an Akt D behandelt. **(B)** Analyse des β -Catenin Levels in Anwesenheit der verschiedenen t(4;11) Fusionsproteine. (n=3; + S.E.M.). Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen *Student's t-test*. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

Zuerst sollte die Akkumulation von β -Catenin unter nukleolärem Stress detektiert werden (Abb. 3.26A). Dazu wurden Zellen der *mock* Zelllinie wieder für 24 h mit verschiedenen Konzentration des Pol⁻Inhibitors Akt D inkubiert. Nach der Zellyse wurde das Proteinlysate mittels SDS-PAGE auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgeladen und bei 20 mA aufgetrennt. Das β -Cateninproteinlevel wurde anschließend im Western Blot mit einem α - β -Catenin-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin. Zu sehen war, dass bereits ab einer Akt D Konzentration von 2,5 nM ein signifikanter Anstieg des β -Cateninproteinlevel zu beobachten war. Dieser betrug bei 2,5 nM Akt D das 1,4 fache, bei 5 nM das 1,6 fache und reduzierte sich bei 10 nM wieder. Bei den verschiedenen t(4;11) transgenexprimierenden, stabilen Zelllinien, zeigte sich nach 48 stündiger Induktion der Transgenexpression mit 1 μ g/ml Doxycyclin, eine signifikante Akkumulation von β -Catenin bei D4, D11, D11m und D4+ D11 exprimierenden Zellen von 1,25, 1,4, 2 und 1,6. Der Anstieg bei D4+ D11m exprimierenden Zellen von 1,3 war hingegen nicht signifikant.

3.7.3 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die *HOXB4* Expression

Beim Homöoboxgen *HOXB4* handelt es sich um einen Stammzellfaktor der zur Proliferation und Zellteilung von HSZ beiträgt (Sauvageau *et al.*, 1995). Eine Aktivierung von β -Catenin, wie in Kapitel 3.7.2 gezeigt, kann zur Reduktion der *HOXB4* Expression führen, die einen Zellteilungsstopp von HSZ zur Folge hat (Kirstetter *et al.*, 2006). Ob diese *HOXB4* Reduktion auf die t(4;11) transgenexprimierenden HEK 293T Zellen zutrifft, sollte durch qPCR Versuche untersucht werden. Dazu wurden die sechs HEK 293T Zelllinien zur Expression der Transgene für 48 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin induziert. Anschließend wurde Gesamt RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und in der qPCR eingesetzt (Abb. 3.27). Zur Amplifikation von *HOXB4* wurden die Starteroligonukleotide HOXB4.RT.for und HOXB4.RT.rev verwendet.

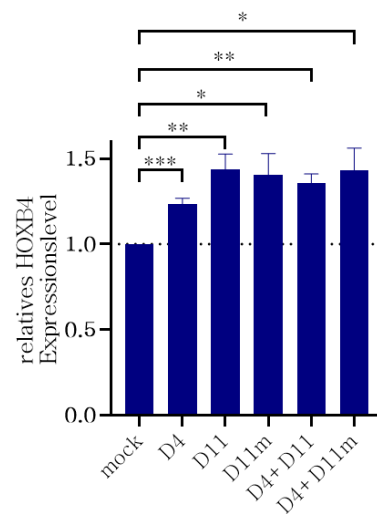


Abb. 3.27 Überprüfung des Einflusses der t(4;11) Fusionsproteine auf die *HOXB4* Expression. Die Expression der stabilen t(4;11) Transgene in HEK 293T Zellen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Nach erfolgter RNA Isolation & cDNA Synthese wurde die Expression des *HOXB4* Gens durch qPCR überprüft. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen GAPDH. Als Referenz diente die *mock* Zelllinie, deren normierte *HOXB4* Expression auf 1,0 gesetzt wurde. Die Analyse erfolgte durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-test. Die p-Werte beschreiben jeweils: ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (n=3; + S.E.M.).

Im Vergleich zur *mock* Zelllinien zeigten alle t(4;11) fusionsgenexprimierenden Zelllinien eine signifikante Steigerung der *HOXB4* Expression. Diese war für *D4* exprimierende Zellen um das 1,25 fache und bei *D11*, *D11m*, sowie den co-exprimierenden Zelllinien um das 1,4 fache erhöht.

3.8 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf H3-Modifikationen im Gesamthistonextrakt

Als epigenetische Regulatoren vermitteln MLL und AF4 Proteinkomplexe, sowie die Fusionsproteine D4 und D11, Histonmodifikationen. Diese beeinflussen die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie. Der Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Generierung solcher Modifikationen sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurde die Expression der Transgene in den verschiedenen stabilen HEK 293T Zelllinien durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h induziert und die Histonproteine im Anschluss mit Hilfe des „*EpiQuik Total Histone Extraction*“ Kits von EpiGentek isoliert.

Die Analyse von unterschiedlichen H3-Modifikationen erfolgte durch anti-körperbasierte Detektion im Western Blot (Abb. 3.28).

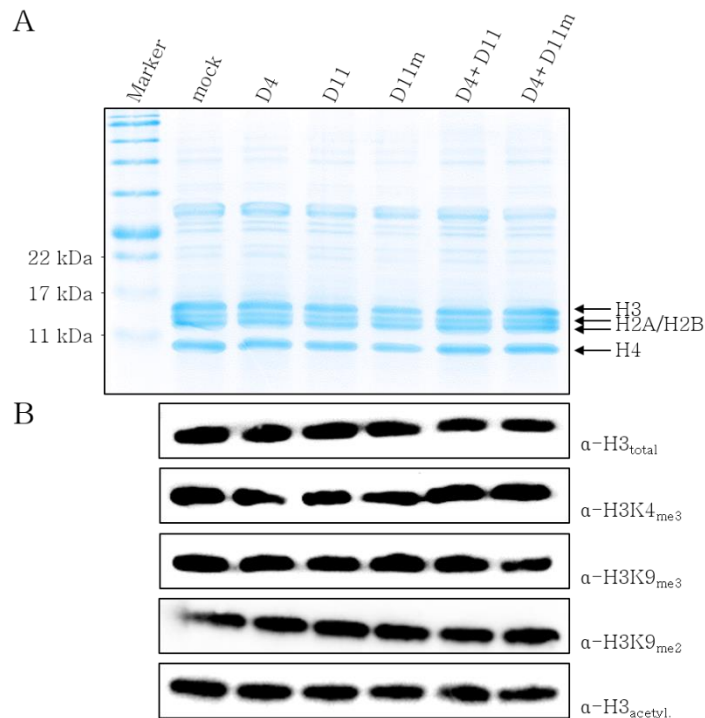


Abb. 3.28 Analyse verschiedener Histonmodifikationen. Die Transgenexpression der sechs stabilen t(4;11) HEK 293T Zelllinien wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert & anschließend Gesamthistone isoliert. **(A)** Überprüfung der Histonanreicherung nach der Isolierung mittels SDS-PAGE. Dazu wurden pro Probe 5 µg Histonextrakt auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgeladen & dieses nach dem Lauf mit Instant Blue® Coomassie angefärbt. **(B)** Die Analyse einzelner Histon H3 Modifikationen erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden jeweils 2 µg Histonextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt & die Proteine anschließend auf eine PVDF Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Primärantikörper und HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Die Detektion von Gesamt-H3 (H3_{total}) diente als Ladekontrolle. (n=3)

Die Überprüfung des Erfolgs der Histonextraktion erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender „Instant Blue®“ Coomassie-Färbung (Abb. 3.28A). Dazu wurden 5 µg der isolierten Histonextrakte auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgeladen und bei 20 mA aufgetrennt. Die zu isolierenden Nukleosomhistone H3, H2A/H2B und H4 besitzen molekulare Massen von 17, 14/14 und 11 kDa. Bei allen sechs Zelllinien sind prominente Proteinbanden mit entsprechenden apparenten Massen vorhanden. Eine Anreicherung der Kernhistone war somit erfolgreich. Die Analyse von H3-Histonmodifikationen erfolgte durch Markierung dieser mit spezifischen Antikörpern im Western Blot.

Dazu wurden 2 μg der Histonextrakte auf ein 15%iges SDS-Gel aufgeladen und bei 20 mA aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF Membran mit Hilfe des Trans-Blot® TURBO™ von BioRad transferiert. Folgende Antikörper wurden zur Untersuchung von H3-Modifikationen verwendet: $\alpha\text{-H3K4}_{\text{me1}}$, $\alpha\text{-H3K4}_{\text{me3}}$, $\alpha\text{-H3K9}_{\text{me2}}$, $\alpha\text{-H3K9}_{\text{me3}}$ und $\alpha\text{-H3K}_{\text{acetyl}}$. Ein $\alpha\text{-H3}_{\text{total}}$ -Antikörper diente als Ladekontrolle. Eine Änderung des Modifikations-levels im H3-Gesamtextrakt konnte bei keiner der t(4;11) transgen-exprimierenden Zelllinien beobachtet werden (Abb. 3.28B).

4 Diskussion

Die t(4;11) Leukämie ist eine Form der Akut Lymphatischen Leukämien (ALL) die als Hochrisikoleukämie eingestuft wird. Ihr zu Grunde liegt eine chromosomale Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 11 die zur Bildung der beiden reziproken Fusionsgene *AF4-MLL* (D4) und *MLL-AF4* (D11) führt. Beiden Fusionsproteinen konnten onkogene Eigenschaften nachgewiesen werden, wobei *MLL-AF4* überwiegend als Hauptauslöser der Leukämie gilt (Tkachuk *et al.*, 1992; Waring & Cleary, 1997; Bardini *et al.*, 2011). Ein 2015 neu entdeckter Mechanismus der Transkriptionsinitiation der Pol II durch Interaktion der pSer Domäne von AF4 und D11 mit dem SL1 Komplex des PIC der Pol I diente als Grundlage dieser Arbeit (Okuda *et al.*, 2015). Die hier durchgeführten Versuche sollten einen Beitrag zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der t(4;11) Fusionsproteine in Bezug auf deren Einfluss auf die RiBi und anschließende Prozesse innerhalb der Zelle leisten. Ein weiterer Aspekt der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde galt der Verbesserung von t(4;11) Modellsystemen. Lin *et al.* ist durch den Austausch der humanen Sequenz des AF4-Parts von *MLL-AF4* (D11) gegen die murine Sequenz von Af4 ein authentischerer Rekapitulation der t(4;11) ALL in HSZ gelungen (Lin *et al.*, 2016). Die Rolle der murinen pSer Domäne sollte im Zusammenhang mit der Interaktion des SL1 Komplexes untersucht und mit der humanen pSer Domäne verglichen werden.

4.1 Beeinträchtigung der Ribosomenbiogenese durch *MLL-AF4*

Die RiBi stellt einen hoch komplexen Prozess innerhalb von Zellen dar der die Produktion von Ribosomen gewährleistet. Sie ermöglicht die Synthese neuer Proteine und ist somit für lebende Zellen essentiell. Die Synthese von Ribosomen fordert einen hohen Energieverbrauch und wird deshalb multifaktoriell reguliert (Hernandez-Verdun *et al.*, 2002; Gorski *et al.*, 2008).

Die RiBi findet hauptsächlich im Nukleolus statt (Abb. 4.1). Sie beginnt mit der Transkription der rRNA Gene durch die Pol I, welche durch die Formierung des PIC von SL1, UBF und RRN3 vermittelt wird. Anschließend wird das 47S Prä-Transkripts in die reifen rRNA Spezies 18S, 5,8S und 28S prozessiert. Diese mehrstufige Prozessierung der rRNA wird von ca. 200 snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) übernommen. Die snoRNAs werden vornehmlich von der Pol II transkribiert. Die vierte rRNA Spezies, die 5S rRNA, wird indes von der Pol III im Nukleoplasma transkribiert. Die 28S, 5,8S und 5S rRNA lagern sich mit 47 ribosomalen Proteinen, welche von der Pol II transkribiert, im Cytoplasma translatiert und in den Nukleolus reimportiert werden, zur 60S Untereinheit und

die 18S rRNA mit weiteren 33 ribosomalen Proteinen zur 40S Untereinheit zusammen. Sie bilden das funktionale 80S Ribosom der höheren Eukaryoten.

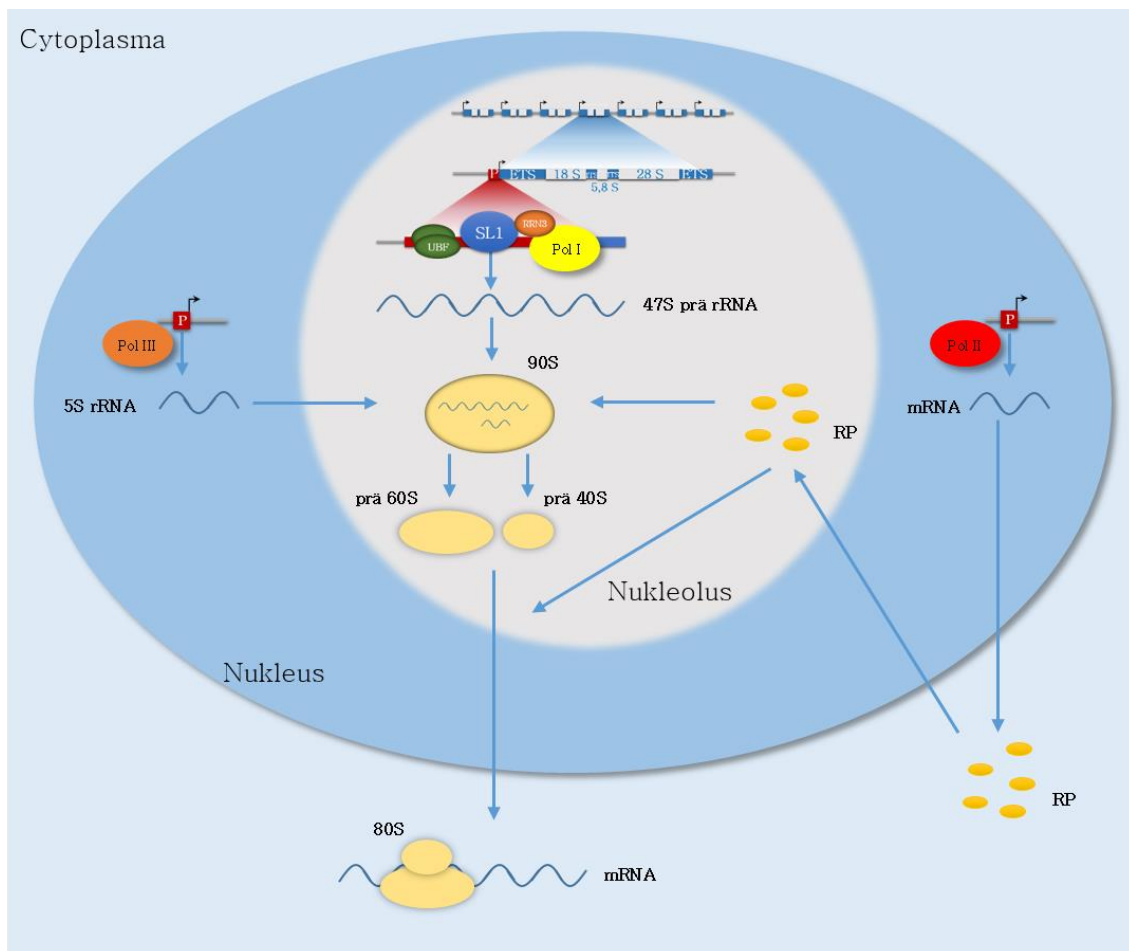


Abb. 4.1 Schema der Ribosomenbiogenese. Die Ribosomenbiogenese beginnt mit der Transkription der rDNA durch die Pol I im Nukleolus. Die Bildung des PICs wird dabei durch den SL1 Komplex, UBF & RRN3 vermittelt. Das Produkt der Pol I Transkription ist die 47S Prä-rRNA. Die Pol II transkribiert währenddessen im Nukleus ribosomalen Protein- (RP) Gene, deren mRNAs im Cytoplasma in Proteine translatiert werden, die dann in den Nukleolus reimportiert werden. Die Pol III produziert ebenfalls im Nukleus die 5S rRNA welche in den Nukleolus transportiert wird. Nach der mehrstufigen Prozessierung der 47S Prä-rRNA in die 28S, 18S & 5,8 S rRNA kommt es zusammen mit den RPs & der 5S rRNA zur Bildung des 90S & weitergehend zur Bildung der Prä-60S & Prä-40S ribosomalen Untereinheiten. Die finale Prozessierung zu 60S & 40S ribosomalen Untereinheiten die gemeinsam das 80S Ribosom der Eukaryoten bilden findet im Cytoplasma statt.

Die in dieser Arbeit generierten stabilen HEK 293T Zelllinien (Kapitel 3.1), welche induzierbare t(4;11) Fusionsgene exprimieren, zeigten eine MLL-AF4 (D11) abhängige Beeinflussung der RiBi. Zunächst zeigten MLL-AF4 (D11) und MLL-AF4m (MLL-AF4 mit muriner pSer Domäne, D11m) exprimierende Zellen

eine, durch ein Luciferase-Reportersystem untersuchte, Reduktion der rRNA Promotoraktivität (Kapitel 3.4.4.3; Abb. 3.18). Diese Reduktion konnte durch eine zusätzliche transiente Expression von TAF₁C::GFP kompensiert werden. TAF₁C ist eine Komponente des SL1 Komplexes, welcher als Teil des PIC der Pol I, zur Initiierung der Transkription der rRNA Gene, dient. Diese stellt den ersten Schritt der RiBi dar. Okuda *et al.* haben eine Interaktion zwischen dem SL1 Komplex, vornehmlich TAF₁C, und der pSer Domäne des AF4 und des MLL-AF4 (D11) Proteins bereits nachweisen können (Okuda *et al.*, 2015). Diese Interaktion konnte in dieser Arbeit durch CoIP Versuche bestätigt werden (Abb. 3.10). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die murine pSer Domäne TAF₁C::GFP in einem deutlich schwächeren Umfang bindet. Dieser Bindekapazitätsunterschied spiegelt sich allerdings in den Untersuchungen der rRNA Promotoraktivität nicht wieder, da MLL-AF4 (D11) und MLL-AF4 mit der murinen pSer Domäne (D11m) eine vergleichbare Reduktion der Promotoraktivität aufwies (Abb. 3.18). Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion von D11 und D11m mit TAF₁C::GFP nicht der einzige Faktor ist, welcher die rRNA Promotoraktivität beeinflussen kann, oder aber das Maximum an Einfluss bereits durch das murine Konstrukt verursacht wird. Die Expression des reziproken Fusionsproteins AF4-MLL (D4) hingegen übte keinerlei Einfluss auf die Promotoraktivität des rRNA Promotors aus. Dies war auch für die Promotoraktivität in den co-exprimierenden Zelllinien zu beobachten, welche eine D11, bzw. D11m entsprechende Reduktion aufzeigten. Da D4 aus dem N-terminalen Part des AF4, ohne pSer Domäne, und dem C-terminalen Part von MLL besteht war eine SL1 abhängige Beeinflussung der rRNA Promotoraktivität auch nicht zu erwarten gewesen. Der generelle Vergleich zwischen HEK 293T Zellen mit und ohne transients TAF₁C::GFP Expression zeigte im Luciferase-Reportersystem eine Steigerung der rRNA Promotoraktivität um knapp 50 %. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die PIC Formation, an der TAF₁C als SL1-Komponente direkt beteiligt ist, als limitierenden Schritt der Pol I Transkription anzusehen ist. In Einklang mit diesem Ergebnis zeigten *live cell imaging*-Untersuchungen in TR9-7 Fibroblastzellen, gekoppelt mit computergestützter Modellierungen von Kinetiken, eine Korrelation zwischen PIC Formierung und transkriptionellem Ertrag in Zellen (Gorski *et al.*, 2008). Ähnliches konnte auch bereits in *S. cerevisiae* gezeigt werden (French *et al.*, 2003). Anschließend erhobene qPCR Daten zur Quantifizierung des 47S rRNA Prä-Transkriptes stehen im Kontrast zu den zuvor ermittelten Promotoraktivitätsdaten (Abb. 3.19). Sie zeigten eine Erhöhung der rRNA Menge von 1,8 bei D11 und 2,2 bei D11m exprimierenden Zellen. Die co-exprimierenden Zelllinien zeigten eine schwache Erhöhung und die Expression von D4 zeigte erneut keine Beeinflussung der rRNA Menge. Die Diskrepanz zwischen rRNA Promotoraktivität und rRNA Gehalt deutet auf einen noch unbekanntem regulatorischen Kompensationsmechanismus hin.

Die Regulation der rRNA Transkription kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen. Erstens durch die Transkriptionsrate der Pol I-Transkriptionsmaschinerie und zweitens über die Anzahl aktiv transkribierbarer rRNA Gene (Grummt & Pikaard, 2003; McStay & Grummt, 2008). Da die rRNA Promotoraktivität, als einen Part der rRNA Transkription, durch die Expression von D11 und D11m negativ beeinflusst wurde, sollte eine mögliche Kompensation durch die Regulation der Anzahl aktiver rRNA Gene untersucht werden. Diese kann entweder durch Chromatinmodellierungen oder UBF erfolgen (Sanij *et al.*, 2008). UBF bindet sowohl den rRNA Promotor, als auch das rRNA Gen und ist an der Initiation der Transkription der Pol I beteiligt (Panov *et al.*, 2006). Durch UBF Bindung wird zusätzlich das Linkerhiston H1 von inaktiven rRNA Genkopien verdrängt und diese somit in aktive rRNA Gene konvertiert (Kermekchiev *et al.*, 1997). In sich ausdifferenzierenden murinen Promyelozytenzellen geht die Inaktivierung von rRNA Geneinheiten mit einer Reduktion des UBF Proteinlevels einher (Poortinga *et al.*, 2004). UBF kann somit als Marker für den Transkriptionsstatus von rRNA Gene fungieren. Um zu überprüfen ob die in der qPCR gemessene Erhöhung der rRNA Menge durch eine vermehrte Anzahl aktiver rRNA Gene zustande kommt, wurde das UBF Proteinlevel über Immunofärbung detektiert und auf die *mock* Zelllinie bezogen (Abb. 3.4.4B). Dabei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen t(4;11) exprimierenden HEK 293T Zelllinien. Eine durch UBF vermittelte Aktivierung inaktiver rRNA Genkopien scheint somit in D11 und D11m exprimierenden HEK 293T Zellen für die Erhöhung der rRNA Menge, trotz reduzierter rRNA Promotoraktivität, nicht verantwortlich zu sein. Eine weitere Möglichkeit der Genaktivierung können DNA- und Histonmodifizierungen darstellen (Santoro & Grummt, 2001, 2005). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass aktive rRNA Geneinheiten hypomethylierte DNA enthalten und von hochacetylierten Histonen umgeben werden (Santoro, Li, & Grummt, 2002; Németh *et al.*, 2008). MLL, AF4, sowie deren onkogene Fusionsproteine stellen chromatin-modellierende Komplexe dar. Obwohl über ChIP gezeigt werden konnte, dass weder D11 noch D11m direkt am rDNA Promotor binden, könnte eine indirekte Beeinflussung über andere Faktoren möglich sein (Abb. 3.12). Für die Histondeacetylase HDAC1, welche ebenfalls von MLL über die RD2 rekrutiert werden kann, konnte beispielsweise eine Beteiligung an der Inaktivierung von rRNA Genen gezeigt werden (Santoro *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2003). Eine Anwesenheit von D11 und damit einhergehende verstärkte Bindung von HDAC1 könnte zu einer reduzierten Verfügbarkeit der inaktivierenden Aktivität von HDAC1 an der rDNA führen und somit die Anzahl aktiver rRNA Genkopien erhöhen. Insgesamt ist die Rolle von Chromatinmodellierungen im Bereich der rDNA in höheren Eukaryoten umstritten. Einige Studien konnte eine Beteiligung an der Regulation der rDNA Einheiten zeigen, während andere dagegen sprechen (Salifou *et al.*, 2016; Herdman *et al.*, 2017). Um den

Gesamteffekt der t(4;11) Transgene auf verschiedene Histonmodifizierungen untersuchen zu können wurden von den transgenexprimierenden HEK 293T Zelllinien Gesamt-histone isoliert und eine Reihe von H3-Modifikationen über Western Blot untersucht (Abb. 3.28). Dabei zeigten sich keine detektierbaren Unterschiede. Um gezielt die Histonmodifikationen am rRNA Promotor detektieren zu können wären zukünftige weitere ChIP Versuche erwägenswert.

In *S. cerevisiae* und Mausfibroblastzellen konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Anzahl aktiver rRNA Gene nur einen geringen Einfluss auf den letztlichen rRNA Ertrag einer Zelle hat und somit einen eher ineffizienten Weg der rRNA Regulation darstellt (French *et al.*, 2003; Sanij *et al.*, 2008). Eine Reduktion des UBF Levels um 90 % führte dabei zu einer Verringerung der Anzahl aktiver muriner rRNA Gene um 70 %. Da die Zellen darauf mit einer gesteigerten Pol I Transkriptionsrate reagierten, betrug die Reduktion des rRNA Ertrags letztlich jedoch nur ca. 10 % (Sanij *et al.*, 2008). Ähnliches konnte auch für *S. cerevisiae* gezeigt werden, wobei die Zellen die Reduktion der aktiven rRNA Genkopien in diesem Fall mit einer Steigerung der Anzahl an Pol I Komplexen pro Geneinheit kompensierten (French *et al.*, 2003). Diese weitere Möglichkeit die rRNA Menge, trotz reduzierter Promotoraktivität, durch die Erhöhung der Anzahl transkribierender Pol I Komplexen pro rRNA Geneinheit zu steigern konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Nach heutigem Forschungsstand geht man davon aus, dass überwiegend die Änderung der Pol I-Transkriptionsrate für die Kurzzeitregulation der rRNA Synthese verantwortlich ist. Dies wurde durch elektronenmikroskopische und *in vivo psoralen-cross-linking* Studien an *S. cerevisiae* und Säugerzellen untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass sich selbst bei exponentiell wachsenden Zellen das Verhältnis von aktiven und inaktiven rRNA Genkopien nicht ändert (Conconi *et al.*, 1989; French *et al.*, 2003).

Weiterhin ist zu beachten, dass die mit dem Luciferase-Reportersystem untersuchte rRNA Promotoraktivität nur die Aktivität dieser einen rRNA Promotoreinheit wiedergibt. Inzwischen gibt es verschiedene Studien die zeigen konnten, dass sich sowohl die rRNA Sequenz, als auch die strukturelle Anordnung von rRNA Geneinheiten weitaus diverser darstellt als stets angenommen wurde und die Bezeichnung der rRNA Gene als rRNA *repeats* (Wiederholungen) nicht mehr vollumfänglich zutrifft. Die ersten Untersuchungen dazu gab es 2005. Caburet *et al.* entdeckten, dass etwa 1/3 der humanen rRNA Geneinheiten strukturelle Abweichungen aufweisen. Sie wurden als nichtkanonisch (*non-canonical*) beschrieben (Caburet, 2005). Weitere Studien ergaben durch Genomsequenzierungen an Mensch und Maus, dass sowohl die Anzahl an rRNA Geneinheiten, als auch die rRNA Gensequenz innerhalb einer Population, aber auch zwischen verschiedenen Zelltypen und Krebszellen, stark variieren können (Wang & Lemos, 2017; Parks *et al.*, 2018).

Diese Unterschiede waren mit einer Erhöhung der Proliferationsrate und der nukleolären Aktivität assoziiert und führten zur Anreicherung von Ribosomenvarianten mit veränderter Proteinsyntheserate. Wie in der Einleitung bereits erwähnt besitzen alle rDNA Geneinheiten, neben den beiden hoch konservierten Motifen CE und UE, durchaus Sequenzvariablen innerhalb der Promotorregion und auch des rRNA Gens (Haltiner *et al.*, 1986; Windle & Sollner-Webb, 1986; Xie & Rothblum, 1992). Es wäre demnach möglich, dass die erhaltenen Daten für die Promotoraktivität die Gesamtheit aller rRNA Geneinheiten nicht vollumfänglich widerspiegeln. Weitere Untersuchungen wären zur Klärung dieser Fragestellung nötig.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Expression der t(4;11) Fusionsgene auch einen Einfluss auf Reifung der rRNA Spezies und der ribosomalen Funktionseinheiten ausübt. Dazu wurde zunächst isolierte Gesamt-RNA auf ein RNA Screen Tape an der Agilent Tape Station 2200 elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert (Abb. 3.20). Durch den Überschuss an 18S und 28S rRNA sind diese beiden Spezies gut quantifizierbar. Bei korrekt ablaufender Prozessierung der 47S Prä-rRNA werden gleich viele 18S, 5,8S und 28S Moleküle generiert, sodass das Verhältnis zueinander bei 1 liegen sollte. Wie in Abb. 3.20 zu sehen ist, ist in Bezug auf die *mock* Zelllinie kein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennbar gewesen. Die Prozessierung der rRNA wird somit von keinem der t(4;11) Fusionsproteine beeinflusst. Gleiches war für die Analyse der funktionalen ribosomalen Einheiten durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation beobachtbar (Abb. 3.21+ Abb. 3.22).

Zusätzlich wurde der Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Proteintranslation untersucht (Abb. 3.23). Dazu wurden die verschiedenen HEK 293T Zelllinien für 30 Minuten in methioninfreiem Medium mit dem Methionin-analogon HPG inkubiert. Dieser wird von den Ribosomen in neu synthetisierte Polypeptidketten eingebaut und kann anschließend über eine „Click it“ Reaktion an eine fluoreszierende Alkylgruppe ligiert, detektiert und quantifiziert werden. Nach anschließender Normalisierung auf die *mock* Zelllinie zeigte sich bei D11 und D11m, sowie den co-exprimierenden Zellen eine Reduktion der Proteinbiosyntheserate um bis zu 40 %. Wie auch bei der Untersuchung der rRNA Promotoraktivität konnte dieses Defizit ebenfalls durch die transiente Expression von TAF₁C::GFP kompensiert werden. Eine Studie von Signer *et al.* untersuchte 2014 die Proteinsyntheseraten von verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen und fand heraus, dass adulte HSZ im Vergleich die niedrigste Proteinsyntheserate aufwiesen (Signer *et al.*, 2014). Bei myeloischen Vorläuferzellen hingegen wiesen Fetale eine niedrigere Rate auf als Adulte (Magee & Signer, 2021). Da eine Erniedrigung der Proteinsyntheserate in D11/D11m exprimierenden HEK 293T Zellen ebenfalls zu beobachten war, deutet dies möglicherweise auf einen induzierten Stammzellcharakter hin. Ebenso dafür

spricht die erhöhte Expression des Stammzellfaktors *HOXB4* (Abb. 3.27). Dass die *HOXB4* Expression, trotz eines verstärkten β -Catenin Levels zu beobachten war deutet auf einen dominierenden Effekt der t(4;11) Fusionsproteine gegenüber dem reprimierenden Effekt von β -Catenin hin (Abb. 3.26).

Eine Störung der RiBi kann zu Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose führen und wird mit dem Alterungsprozess, altersbedingten degenerativen Erkrankungen und auch Krebs assoziiert (Hetman & Pietrzak, 2012; Parlato & Liss, 2014; Turi *et al.*, 2019). Eine Studie von Volarevic *et al.* zeigte erstmals, dass eine Störung der RiBi durch *knock out* des ribosomalen Proteins RPS6 in Mausleberzellen einen Zellzyklusstop induziert (Volarevic, 2000). Seither wurde in vielen Studien bewiesen, dass eine Störung von nahezu jedem Schritt der RiBi zu einem Zellzyklusarrest führen kann (Turi *et al.*, 2019). Dieser Prozess wird hauptsächlich durch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 eingeleitet und als *Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint* (IRBC) bezeichnet (Rubbi & Milner, 2003; Kalita *et al.*, 2008; Gentilella *et al.*, 2017). Während einer intakten RiBi, vornehmlich rRNA Transkription, wird p53 von der E3-Ubiquitinligase MDM2 (*murine double minute 2 protein*, auch HDM2 genannt) ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut (Honda, Tanaka, & Yasuda, 1997). Kommt es hingegen zu einer Beeinträchtigung der rRNA Transkription translozieren freie ribosomale Proteine vom Nukleolus zurück in den Nukleus und binden MDM2. Dadurch wird die Ubiquitinierung von p53 verhindert und es kommt zu dessen Akkumulation. Daraufhin werden p53-Zielgene, welche die Genomstabilität, Zellzyklusarrest und Apoptose regulieren, aktiviert (Pestov, Strezoska, & Lau, 2001).

Viele Krebsarten zeichnen sich durch eine erhöhte RiBi, welche mit exzessivem Wachstum und einer übermäßigen Teilungsrate in Verbindung gebracht wird, aus (Montanaro, Treré, & Derenzini, 2008). Die Umgehung des IRBC kann dabei durch die Inaktivierung von TP53 ermöglicht werden, dessen Mutation in vielen Krebsarten auftritt und hauptsächlich der erhöhten Zellproliferation dient (Zhai & Comai, 2000; Pestov *et al.*, 2001). In wie weit sich der Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf p53 auswirkt wurde mit Hilfe von immunologischen Nachweisen mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.25). Dafür wurde zunächst die Anreicherung des p53 Proteins unter nukleolärem Stress durch Zugabe von verschiedenen, geringen Konzentrationen des Pol I Transkriptioninhibitors Akt D in HEK 293T Zellen bestätigt. Während 2,5 nM Akt D keine signifikante Erhöhung des p53 Proteinlevels bewirkte, zeigten 5 nM und 10 nM Akt D eine Anreicherung von p53 um ca. 70 %, bzw. ca. 120 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Beim Vergleich der t(4;11) exprimierenden Zelllinien mit der *mock* Zelllinie zeigte sich eine leichte Erhöhung des p53 Proteinlevels in Anwesenheit der Fusionsproteine D11 um ca. 10 %, und bei D11m und D4+D11 um ca. 40 %. Die Viabilitätsdaten deuten auf keine signifikante

Apoptoseinduktion in den t(4;11) fusionsgenexprimierenden Zelllinien hin (Abb. 3.5). Ein möglicher Mechanismus die durch nukleolären Stress induzierte p53-abhängige Apoptoseinduktion zu umgehen wurde erst kürzlich entdeckt (Dannheisig *et al.*, 2021). Dabei führte nukleolärer Stress, induziert durch den *knock down* von nukleolären Schlüsselproteinen wie PPAN, NPM, PES1 und SBDS, oder die Behandlung mit Akt D, bzw. dem Pol I-Transkriptioninhibitor CX-5461 in der Osteosarkom-zelllinie U2OS, zu einer Überstimulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges. Da dieser auch unter physiologischen Bedingungen an der Regulation der RiBi beteiligt ist, führt die Überstimulation zur Stabilisierung von β -Catenin und ermöglicht dadurch eine Art Kompensierung der p53-induzierbaren Apoptose. Dieser Mechanismus stellt eine neu identifizierte Form der nukleolären Stressantwort mit pro-onkogenem Charakter dar. Ob der Wnt/ β -Catenin Signalweg ebenfalls durch Anwesenheit der t(4;11) Fusionsproteine aktiviert wird wurde erneut anhand von Western Blots untersucht (Abb. 3.26). Wieder diente eine Akt D Behandlung der HEK 293T Zellen als Kontrolle zur Induktion von nukleolärem Stress. Die größte Anreicherung mit einer Zunahme von ca. 63 % erreichte das β -Catenin Level bei einer Behandlung mit 5 nM Akt D. Die t(4;11) exprimierenden Zellen zeigten alle eine Anreicherung des β -Catenin Proteinlevels, wobei D11m exprimierende Zellen mit 110 % Steigerung den größten Effekt aufwiesen. Ob es sich hierbei um eine direkte oder indirekte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges handelt ist unklar. In MLL-AF9 exprimierenden murinen hämatopoetischen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass eine Überstimulierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges zu einer Reduktion der Sensitivität der Zellen gegenüber BET-Inhibitoren führte (Fong *et al.*, 2015). Diese konnte durch Runterregulierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges wieder relativiert werden. Eine weitere Studie konnte ebenfalls zeigen, dass MLL-AF9 Leukämiezellen verstärkt β -Catenin exprimieren und in Folge dessen eine Sensitivität gegenüber Wnt/ β -Catenin Signalweg-Inhibitoren aufwiesen (Zhang *et al.*, 2019). Die Behandlung von MLL-AF9 transformierten Zellen mit Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin Signalweges ist auch deshalb vielversprechend, weil die Behandlung keinerlei Einfluss auf die Homöostase oder Differenzierung von untransformierten Blutzellen zeigte. Möglicherweise stellt der Wnt/ β -Catenin Signalweg somit auch für die t(4;11) Leukämie ein geeignetes Therapieziel dar.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass die t(4;11) Fusionsproteine D11 und D11m zu einer Reduktion der rRNA Promotoraktivität, sowie der Proteinsynthese führen. Diese jedoch die Gesamtmenge an rRNA innerhalb der Zelle steigern und auf die Prozessierung und Assemblierung der ribosomalen Einheiten keinen Einfluss ausüben. Ob die reduzierte Proteinsyntheserate eine Folge der Reduktion der rRNA Promotoraktivität ist oder umgekehrt die reduzierte Proteinsyntheserate einen inhibitorischen Effekt auf die rRNA

Promotoraktivität ausübt bleibt vorerst unklar. Trotz dieser Beeinträchtigung wiesen die transgenexprimierenden Zellen eine Erhöhung der Proliferation und des ATP Gehalts auf (Abb. 3.24). Des Weiteren scheint diese Beeinflussung der RiBi in den Zellen nukleolären Stress auszulösen. Eine daraus resultierende p53-abhängige Apoptoseinduktion kann jedoch durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs unterdrückt, bzw. reduziert werden.

4.2 MLL-AF4 vermittelte Grenzüberschreitung zwischen Nukleus und Nukleolus

Der wahrscheinlich zentralste Prozess innerhalb einer lebenden Zelle ist die Transkription von DNA in RNA. Sie ermöglicht entweder die anschließende Produktion von Proteinen oder generiert funktionale, nicht kodierende RNAs (*ncRNAs*). Ermöglicht wird sie von DNA-abhängigen RNA Polymerasen. Während Prokaryoten und Archaeen jeweils nur eine einzelne RNA Polymerase besitzen, verfügen Eukaryoten über drei solcher Enzyme. Alle RNA Polymerasen haben zwei Untereinheiten mit doppel- ψ β -*barrel* Motif gemeinsam. Dieses bildet das aktive Zentrum. Der heutigen Annahme nach stammen sie von einer Duplikation eines Gens ab, welches für einen Protein-Cofaktor eines Ribozyms mit RNA Polymeraseaktivität kodierte (Iyer, Ozdag, & Caldas, 2004). Dieses muss vom letzten universellen, gemeinsamen Vorfahren (*last universal common ancestor*; LUCA) aus der ursprünglichen RNA Welt abstammen (Burton, 2014).

Die drei eukaryotischen RNA Polymerasen I, II und III (Pol I, Pol II, Pol III) sind für die Produktion von jeweils spezifischen Genklassen verantwortlich. Die Pol I synthetisiert die rRNA-Vorläuferkomponenten der Ribosomen im Nukleolus. Die Pol II transkribiert hingegen hauptsächlich protein-kodierende Gene und produziert damit mRNAs (*messenger RNAs*), die an den Ribosomen im Cytoplasma in Proteine translatiert werden. Die letzte Klasse der RNA-Polymerasen, die Pol III produziert tRNAs (*transfer RNAs*), die 5S rRNA, sowie weitere kleine ncRNAs (Roeder & Rutter, 1970; Weinmann & Roeder, 1974). Letztere beiden RNA Polymerasen sind im Nukleoplasma des Nukleus lokalisiert.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben üben sowohl D11, als auch D11m, einen Einfluss auf die RiBi aus. Die Expression der Fusionsgene führte zu einer Reduktion der rRNA Promotoraktivität, die jedoch letztlich durch einen unbekanntem Kompensationsmechanismus zu einer Erhöhung der Gesamt rRNA Menge in den Zellen führte (Abb. 3.18+ Abb. 3.19). Des Weiteren war eine mit den Promotoraktivitätsstudien vergleichbare Reduktion der Proteinbiosynthese in den Zellen zu beobachten (Abb. 2.23). Sowohl die Reduktion der rRNA

Promotoraktivität, als auch die der Proteinsynthese konnten durch transiente Expression von TAF₁C::GFP kompensiert werden (Abb. 3.18+ Abb. 3.23). Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine Interaktion zwischen D11, bzw. D11m und TAF₁C, als Komponente des SL1 Komplexes, für die Beeinträchtigungen verantwortlich sein könnte. Bei der für die Interaktion verantwortlichen Domäne des D11 handelt es sich um die pSer Domäne des AF4 Parts im MLL-AF4 (D11). Diese Interaktion wurde 2015 von Okuda *et al.* bereits identifiziert und konnte in dieser Arbeit ebenfalls für die murine pSer Domäne bestätigt werden (Abb. 3.10). In dieser Publikation konnte ebenfalls gezeigt werden, dass AEP Proteine, zu denen AF4 gehört und MLL-AEP Fusionsproteine in der Lage sind den SL1 Komplex zu nutzen um die Transkription der Pol II zu initiieren. Gezeigt wurde dies durch einen shRNA (*short hairpin RNA*) vermittelten *knock down* von *Taf1c* in MLL-ENL transformierten iMEF-Zellen (*irradiated mouse embryonic fibroblasts*) und anschließender Quantifizierung der Expression von MLL-AEP Zielgenen. Auch im nicht onkogenen Kontext konnte auf diese Weise eine Nutzung von SL1 zur Initiierung der Pol II Transkription über AF4 nachgewiesen werden. Dabei bindet AEP/MLL-AEP zusammen mit SL1 an Pol II Zielpromotoren und rekrutiert TBP zur Initiierung der Transkription. Diese Entdeckung, die erstmals eine AF4-assoziierte Schwächung der Grenze zwischen Pol I und Pol II Transkription beschrieb, diente als Ausgangspunkt für diese Dissertation. Dass die Reduktion der rRNA Promotoraktivität durch die D11 vermittelte Rekrutierung des SL1 Komplexes zu Zielgenen im Nukleus und einer damit einhergehenden Unterversorgung von SL1 am rRNA Promotor bedingt wird wäre denkbar.

Da die Pol II Transkription vornehmlich im Nukleus stattfindet, während die Transkription durch die Pol I im Nukleolus angesiedelt ist, stellt sich die Frage, in wie weit die Interaktion zwischen D11/D11m mit dem SL1 Komplex die Subkompartimentierung innerhalb des Nukleus beeinträchtigt. Um dies zu untersuchen wurde sowohl die Lokalisation von D11::mCh/D11m::mCh, als auch von der Pol II, durch Immunfluoreszenzfärbung detektiert (Abb. 3.11+ Abb. 3.13). Zur Identifizierung der Nukleoli von HEK 293T Zellen diente UBF als nukleolärer Marker. Dabei zeigte sich, dass beide Fusionsproteine innerhalb der Nukleoli angereichert vorlagen. Zusätzlich konnte in Anwesenheit von D11::mCh/D11m::mCh ebenfalls eine deutliche Anreicherung der Pol II in den Nukleoli nachgewiesen werden. Eine nukleoläre Pol II wurde bereits in *S. cerevisiae* nachgewiesen, welche jedoch nicht mit der rRNA Expression assoziiert werden konnte (Santangelo *et al.*, 1988; Ganley *et al.*, 2005; Kobayashi & Ganley, 2005). Erst kürzlich konnte in Säugerzellen eine Regulation der RiBi durch die Pol II identifiziert werden (Abraham *et al.*, 2020). Durch die Transkription von Genloci innerhalb der intergenen Bereiche (IGS) zwischen den rRNA Geneinheiten durch die Pol II kommt es zu strukturellen

Veränderungen, sogenannten R-loops aus Triplex-Nukleinsäuremolekülen, die die Transkription der rRNA durch die Pol I begünstigen. Durch weitere ChIP Studien konnte für die Pol II eine direkte Bindung im Promotorbereich des rDNA Chromatins gezeigt werden, welche in Anwesenheit von D11::mCH deutlich erhöht wurde (Abb. 3.13). Da eine vergleichbare Erhöhung in Anwesenheit von D11m::mCh nicht zu beobachten war deutet dies auf einen human-pSer-abhängigen Mechanismus hin (Abb. 4.2). Eine direkte Bindung der Pol II an der pSer Domäne konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden, was die Beteiligung eines weiteren, bisher unbekanntem Faktors wahrscheinlich macht (Okuda *et al.*, 2015). Für die Fusionsproteine selbst konnte keine direkte Bindung am rDNA beobachtet werden, was auf einen indirekten Einfluss schließen lässt (Abb. 3.11).

In wie weit die Interaktion der Pol II am rDNA Chromatin auch einen Einfluss auf die rRNA Transkription ausübt, sowie die Frage in welchem Rahmen auch die Pol III von D11/D11m beeinflusst werden könnte bleibt zunächst offen und sollte Fragestellung zukünftiger Untersuchungen sein.

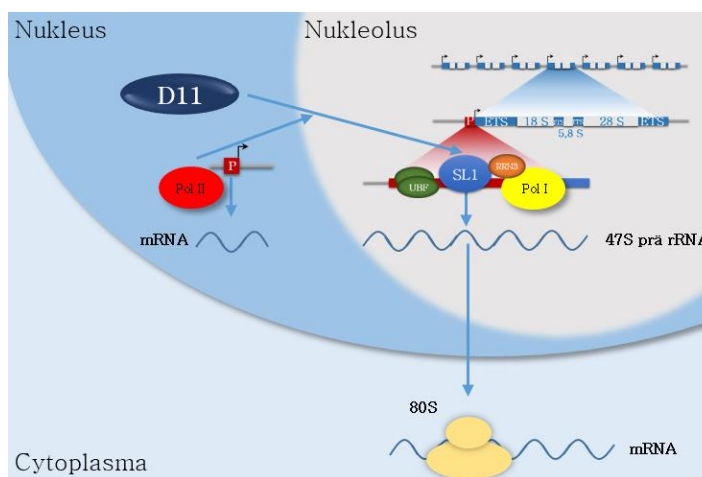


Abb. 4.2 Modell der D11 induzierten Co-Lokalisierung der Pol II am rRNA Promotor. Durch die Expression von D11, welches sich im Nukleolus der Zelle anreichert, kommt es zu einer Co-Lokalisierung der Pol II im Nukleolus. Zusätzlich vermittelt D11 in diesem Zusammenhang die Bindung der Pol II am rRNA Promotor. Welche Effekte dies auf die rRNA Transkription durch die Pol I, sowie weitergehend auf die Proteinbiosynthese im Cytoplasma ausübt bleibt vorerst unbekannt.

Eine Beeinträchtigung der RiBi, wie in dieser Arbeit durch Expression von D11 und D11m in HEK 293T Zellen gezeigt werden konnte, geht oftmals mit Veränderungen der Nukleolimorphologie einher. Für verschiedene Krebsarten konnte gezeigt werden, dass Nukleoligröße und -aktivität mit dem Tumor-

wachstum korrelieren können (Derenzini *et al.*, 2000). Somit lassen sich morphologische Alterationen als diagnostische Marker für Krebszellen verwenden. Auch für Leukämiezellen kann die Morphologie der Nukleoli als diagnostisches Werkzeug eingesetzt werden (Smetana, 2009). Zwei Studien konnten zeigen, dass gesunde und an B-Zell-CLL erkrankte Patienten unterschiedliche Nukleolimorphologien aufwiesen und diese Patienten darüber hinaus in zwei Subpopulationen eingeteilt werden konnten, deren Nukleolimorphologie direkt mit der Schwere, dem Verlauf und dem Ansprechen auf Therapien assoziiert waren (Klobusicka *et al.*, 2010; Smetana, Karban, & Trneny, 2010). Dabei repräsentierten kleine, ringförmige Nukleoli gesunde Lymphozyten, während sich die Nukleoli von schwerer Erkrankten größer und unförmiger darstellten. Diese Beobachtungen entsprechen den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen. Dabei konnten nach der Fixierung von HEK 293T Zellen, die Nukleoli der Zellen am Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (Abb. 3.15). Im Vergleich zur *mock* Kontrolle zeigten Zellen welche D11, bzw. D11m exprimierten ebenfalls deutlich weniger, dafür aber größere, unförmigere Nukleoli. Allgemein wird angenommen, dass eine Zunahme der Nukleoligröße bei Krebszellen direkt aus einer verstärkten RiBi hervorgeht um damit den erhöhten Bedarf an Ribosomen für Wachstum und Vermehrung von Krebszelle decken zu können (Derenzini *et al.*, 1998).

Die Beobachtungen zum Einfluss den D11, bzw. D11m, auf den Prozess der RiBi ausüben und die damit einhergehende Grenzüberschreitungen zwischen Pol I und Pol II Transkription, sowie die Konsequenzen für die nukleäre Subkompartimentierung als Ganzes eröffnen womöglich neue Therapieansätze für die t(4;11) Leukämie.

4.3 Ribosomenbiogenese als Therapieziel

In der westlichen Welt zählen Krebserkrankungen zur Mehrheit der durch Krankheit verursachten Todesfälle (Bray *et al.*, 2018). Obwohl sich Krebstherapien in Bezug auf Wirkung und Verträglichkeit durch den Einsatz von neuen, präzisen Antikörper- und Immuntherapieformen verbessert haben, gibt es, bedingt durch die Heterogenität verschiedener Krebsformen, noch immer einen Bedarf an der Entwicklung und Weiterentwicklung von Chemotherapieverfahren (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

Die Behandlung akuter *MLL-r*-Leukämien ist nicht auf die jeweilige Translokation abgestimmt und besteht üblicherweise aus zytotoxischer Chemotherapie (Grimwade *et al.*, 2010; Marks *et al.*, 2013). Die Initialtherapie besteht standardmäßig aus Dexamethason oder Prednisolon in Kombination mit Vincristin und möglicher Ergänzung durch Daunorubizin oder Doxorubizin. Die Rückfallquote ist durch auftretende chemotherapieresistente Leukämiezellen

bei t(4;11) Patienten im Säuglingsalter mit am höchsten und verdeutlicht die Unzulänglichkeit der Standardtherapie (Pieters *et al.*, 2019). Auch die Durchführung von Stammzelltransplantationen stellt bei Säuglingen mit ALL nur bedingt eine Alternative zur Monochemotherapie dar (Mann *et al.*, 2010). Zusätzlich kompliziert die Diversität der MLL-Rearrangements, aufgrund der Vielzahl an MLL-Fusionspartnern, mögliche Therapiestrategien (Meyer *et al.*, 2018).

Durch die stetige Erforschung der Pathomechanismen von MLL-Fusionsproteinen befinden sich inzwischen einige spezifische Inhibitoren dieser in verschiedenen präklinischen und klinischen Phasen.

- BET-Inhibitoren blockieren die Aktivität der Bromodomäne von BRD4 (Filippakopoulos *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2011)
- DOT1L-Inhibitoren unterbinden die Methyltransferaseaktivität von DOT1L (Daigle *et al.*, 2013)
- SET-Inhibitoren unterdrücken die Methyltransferaseaktivität von MLL (Cao *et al.*, 2014)
- MENIN1/LEDGF-Inhibitoren verhindern die Bindung an Zielgene (Čermáková *et al.*, 2014)

Ein gemeinsamer Nachteil dieser Inhibitoren ist die Tatsache, dass neben der Fusionsproteine auch die Wildtypproteine beeinträchtigt werden.

In den vergangenen 10 Jahren sind die RiBi und ihre Regulation verstärkt in den Fokus der Krebstherapie gerückt. In vielen Krebsarten ist zu beobachten, dass die Aktivierung von Protoonkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren oftmals eine Steigerung der rRNA-Transkriptionsrate, als initialen Schritt der RiBi, zur Folge hat (Treré *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2011). Beispielsweise wird in verschiedenen hämatologischen Krankheiten, einschließlich Leukämien, der protoonkogenwirkende Transkriptionsfaktor MYC überexprimiert. Dies führt zu einer Beschleunigung des Zellzyklus und damit einhergehend vermehrtem Wachstum von Krebszellen (Eilers *et al.*, 1989). Darüber hinaus ist MYC in der Lage direkt an den rRNA Promotor zu binden, den SL1 Komplex und UBF zu rekrutieren und dadurch die rRNA Transkription zu initiieren (Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005). Dies führt zur Erhöhung der RiBi-Rate (Chan *et al.*, 2011).

Die RiBi ist ein streng kontrollierter und hoch variabler Prozess. Bereits das Fehlen einer einzelnen Aminosäure führt in Mauszellen zu einer von der Initiierungsfrequenz abhängigen Reduktion der rRNA Transkription um den Faktor 2–3 (Grummt, Smith, & Grummt, 1976). Außerdem wurde gezeigt, dass das intrazelluläre ATP Level direkt mit der rRNA Transkription korrelieren kann (Grummt & Grummt, 1976). Anhand der t(4;11) fusionsgenexprimierenden HEK 293T Zellen konnte eine Erhöhung des ATP Gehalts von 20 – 40 %

beobachtet werden, welche bei D11 am stärksten war und für D11, sowie D11m mit einer Erhöhung des rRNA Levels übereinstimmt (Abb. 3.24+ Abb. 3.19).

Die RiBi korreliert mit Proliferation und Zellteilungsrate, weshalb schnell wachsende Krebszellen häufig einen erhöhten Bedarf an Ribosomen und somit auch eine gesteigerte RiBi-Aktivität aufweisen. Dadurch können Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen, mit niedriger RiBi-Rate, sensitiver gegenüber Substanzen, die die RiBi, oder die Proteinbiosynthese inhibieren, sein. Da dieser erhöhte Bedarf auf eine Vielzahl von Krebsarten zutrifft, ermöglichen entsprechende therapeutische Substanzen eine breite Indikation und könnten zur Therapie von vielen Krebsarten eingesetzt werden.

Generell lassen sich bei der RiBi drei Angriffslevel definieren: Inhibierung der rRNA Transkription, Inhibierung der Prozessierung und Assemblierung der ribosomalen Einheiten und die Inhibierung der ribosomalen Proteintranslation. Eine Auswahl an chemotherapeutischen Substanzen und ihre inhibitorischen Funktionen sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 4.1 Auswahl an chemotherapeutischen Substanzen welche die RiBi, bzw. die Proteintranslation inhibieren. (Catez *et al.*, 2019)

Substanz	Wirkmechanismus	Zielprozess
Akt D	Interkalierung in GC-reiche DNA, Inhibierung der rRNA Transkriptions-elongation	rRNA Transkription
CX-5461	Störung der Bindung von SL1 am rDNA Promotor, Inhibierung der rRNA Transkriptionsinitiation	
U3/U8 silencing	Inhibierung der rRNA Prozessierung	rRNA Prozessierung & Assemblierung
5-Fluorouracil (5-FU)	Einbau von 5-FU in Prä-rRNA	
Haemanthamine	Inhibierung der rRNA Prozessierung	Proteintranslation
	Sterische Blockade der Translation	

Die Inhibierung der rRNA Transkription durch die Pol I, als ersten Schritt der RiBi, hat den Vorteil, dass sie durch die Transkription eines einzelnen Transkriptes, hoch spezifisch ist. Dadurch ließen sich womöglich unerwünschte Nebenwirkungen, wie sie durch die Inhibierung der Transkription der Pol II, welche alle proteinkodierenden Gene und ncRNAs transkribiert, vermeiden.

Ein RiBi-inhibierendes Chemotherapeutikum in der Anwendung ist Akt D, auch Dactinomycin genannt (Sobell, 1985). Es dient der Behandlung verschiedener Krebsarten. Gegen AML wird es beispielsweise als Kombinationspräparat eingesetzt (Hassan & Rees, 1990). Es interkaliert in GC-reiche DNA Region,

wie sie vor allem im Bereich der rRNA Gene gehäuft auftreten, inhibiert die rRNA Transkriptionselongation und induziert Apoptose (Hollstein, 1974; Fetherston, Werner, & Patterson, 1984; Muscarella *et al.*, 1998). Die Spezifität gegen die Pol I Transkription ist bei Akt D jedoch nur moderat und kann, vor allem in höheren Dosen, auch die Pol II Aktivität beeinträchtigen. Es gehört deshalb zu den semi-selektiven Pol I Transkriptioninhibitoren (Drygin *et al.*, 2011).

Der spezifische Pol I Inhibitor CX-5461 befindet sich zurzeit in der klinischen Phase I Studie für die Behandlung verschiedener Krebsarten wie u.a. Myelomen, Neuroblastomen, Osteosarkomen, Ovarien- und Prostatakrebs und Leukämie (Negi & Brown, 2015a; Li *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2017; Cornelison *et al.*, 2017; Niemas-Teshiba *et al.*, 2018; Lawrence *et al.*, 2018). Der Wirkmechanismus ist auf die Verhinderung der rRNA Transkriptionsinitiation zurück zu führen (Drygin *et al.*, 2011). In Kolonkreb- (HCT-116), Pankreaskreb- (MIA PaCa-2) und Melanomzelllinien (A375) konnte über ChIP gezeigt werden, dass CX-5461 die Bindung des SL1-Komplexes, vornehmlich TAF_IC und TBP, an den rDNA Promotor stört und damit die Initiierung der Pol I Transkription um bis zu 60 % reduzieren kann. Bei einer Untersuchung von CX-5461-behandelten ALL Zelllinien mit verschiedenen chromosomalen Translokationen, darunter auch zwei t(4;11) Zelllinien, konnte CX-5461 eine caspase-abhängige Apoptose induzieren die p53-unabhängig war (Negi & Brown, 2015b). Dem entgegen steht eine Studie von Bywater *et al.* Hier konnte anhand von B-Lymphomzellen eine p53-abhängige Apoptoseinduktion nach Behandlung mit CX-5461 beobachtet werden (Bywater *et al.*, 2012). Die Beobachtung, dass die RiBi von gesunde Zellen erst bei deutlich höheren Einsatzkonzentrationen *in vitro* und *in vivo* beeinträchtigt wird, unterstreicht den Nutzen als Therapeutikum. So wies CX-5461 beispielsweise einen IC₅₀ von ca. 3 nM in EOL-1 Leukämiezellen und ca. 5 µM in gesunden Fibroblastzellen auf (Drygin *et al.*, 2011). Ebenso konnte diese antitumoröse Selektivität auch in Mausversuchen bestätigt werden. Zusätzlich führte die Behandlung zur Aktivierung von den Zellzykluskontrollpunkt-kinasen CHK1 und CHK2 und resultierte in einen G2-Arrest. Dieser konnte durch die Kombination mit einem ATR-Kinaseinhibitor überwunden werden und zum effizienteren Zelltod der Leukämiezellen beitragen. Ebenfalls eine Kombination aus CX-5461 und Chloroquin, einem Autophagieinhibitor, konnte zu einer Erhöhung der Apoptoserate in ALL-Zellen führen (Okamoto *et al.*, 2020). Der Umstand, dass D11 eine direkte, im Vergleich zu WT-AF4 verstärkte Interaktion mit dem SL1-Komplex aufwies, betont den Nutzen, den die Behandlung mit CX-5461 im Rahmen der t(4;11) Leukämie darstellen könnte. Die Nutzung des SL1 Komplexes zur Initiierung der Pol II Transkription von MLL Zielgenen, stellt

womöglich einen neuen Ansatzpunkt für die Identifizierung weiterer ähnlicher chemotherapeutisch wirkender Substanzen dar.

Ziel dieser chemotherapeutischen Substanzen im Allgemeinen ist die Reduktion oder vollständige Inhibierung der RiBi, bzw. der Proteintranslation in Krebszellen. Interessanterweise weisen nicht alle Krebsarten eine gesteigerte RiBi Aktivität auf. Dies trifft insbesondere auf Patienten mit proliferationsarmen Ribosomopathien zu, die ein erhöhtes Risiko aufweisen an hyperprofilierendem Krebs zu erkranken. Ribosomopathie ist der Überbegriff für eine Reihe von Krankheiten die durch Defekte in ribosomalen Proteinen, oder anderen Faktoren der RiBi ausgelöst werden (Armistead & Triggs-Raine, 2014). Dazu zählen u.a. die Diamond Blackfan Anämie, das Schwachman-Diamond Syndrom und das 5q-Syndrom (Josephs, 1936; Schwachman *et al.*, 1964; Van den Berghe *et al.*, 1974). Die jeweiligen zu Grunde liegenden Mutationen gehen stets mit einer Reduktion der RiBi- und Proteinbiosyntheserate einher und führen zur p53 induzierten IRBC. Der kausale Zusammenhang zwischen Ribosomopathien und dem Auftreten von Krebserkrankungen ist in den vergangenen Jahren mit in den Fokus der Forschung gerückt und spiegelt die Komplexität der RiBi im onkogenen Kontext wieder. Beispielweise weisen Patienten mit Schwachman-Diamond-Syndrom im Alter von 20 Jahren ein 19 %iges Risiko auf ein myelodysplastisches Syndrom oder eine AML zu entwickeln. Bei 30-jährigen Patienten liegt dieses Risiko sogar bei 36 % (Donadieu *et al.*, 2005). Eine Schlüsselrolle kommt dabei p53 zu. Wie bereits erwähnt führt die Störung der RiBi zur Assoziation von RPs mit MDM2, was zur Folge hat, dass p53 nicht proteasomal abgebaut wird und akkumuliert. Die Normalisierung einer p53 induzierten Stressantwort steht daher im Fokus neuer Therapieansätze. (Liu, 2011; Zhang *et al.*, 2017). Da die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls mit einer durch D11/D11m induzierten Beeinträchtigung der RiBi, ohne signifikante p53 induzierte Apoptose einhergehen, könnte sich p53 als mögliches neues Therapieziel im Rahmen der t(4;11) Leukämie präsentieren. Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die zeigen konnte, dass p53, über die MDM2-Achse hinaus, die Pol I Transkription, direkt beeinflussen kann (Budde & Grummt, 1999; Zhai & Comai, 2000). Dabei interagiert p53 direkt mit den SL1-Komponenten TBP und TAF₁C und verhindert somit die Bildung des PICs am rDNA Promotor.

Das Auftreten einer reduzierten RiBi im leukämischen Kontext wurde bereits 2015 beschrieben (Cai *et al.*, 2015). Der Transkriptionsfaktor RUNX1 ist im Rahmen von Leukämien häufig von Mutationen betroffen (Mangan & Speck, 2011). Cai *et al.* konnten zeigen, dass HSZ mit *RUNX1* Mutationen die zum Funktionsverlust des Proteins führen einen Selektionsvorteil aufwiesen. Die Zellen waren morphologisch kleiner, zeigten ein verlangsamtes Wachstum und eine reduzierte RiBi. Durch eine zusätzliche Reduktion des p53 Levels, sowie

eine geschwächte Stressantwort auf ungefaltete Proteine, waren die Zellen folglich apoptoseresistenter gegenüber genotoxischem Stress. Diese Entdeckung enthüllte einen neuen Mechanismus, bei dem *RUNX1*-Mutationen durch reduzierte RiBi-Aktivität zu einer stressresistenteren HSZ-Population mit selektivem Vorteil gegenüber unmutierten HSZ aufweisen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass die RiBi und das Zusammenspiel von Pol I und Pol II eine größere Rolle im Kontext einer t(4;11) Leukämie zukommt, als bisher angenommen und diese als neues Therapieziel einen vielversprechenden Beitrag zu Verbesserung der Behandlung beitragen könnte.

4.4 Nutzung chimärer Fusionsproteine zur Verbesserung von t(4;11) Modellsystemen

Die niedrige Rate an Sekundärmutationen zeichnet *MLL-r* Leukämien aus und unterstreicht damit die Potenz der *MLL*-Fusionsproteine bei der Entstehung einer Leukämie (Ayton & Cleary, 2001; Bursen *et al.*, 2010; Szczepański *et al.*, 2010). Dieser Umstand begünstigt die Generierung von Modellsystemen durch Expression der *MLL*-Fusionsgene im Modellorganismus oder der Modellzelllinie. Für die t(4;11) Leukämie trifft dies jedoch nur bedingt zu. Anstelle einer ALL entwickelt sich im murinen Modellsystem häufig eine AML oder ein Lymphom (Lavau, 1997; Chen *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008b). Ein möglicher Grund dafür könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Blutzellbestandteile zwischen Mensch und Maus darstellen (Mestas & Hughes, 2004). Während humanes Blut einen hohen Anteil an Neutrophilen aufweist, ist das Blut von Mäusen sehr reich an Lymphozyten. Dieser Umstand könnte ggf. im murinen Modellsystem Auswirkungen auf leukämische Zellen haben, die auf den Menschen nicht übertragbar sind. In einem neuen Ansatz aus dem Jahre 2016 wurde anstelle eines *MLL-AF4 (D11)*, ein *MLL-Af4* für die Transduktion verwendet (Lin *et al.*, 2016). Der Austausch der humanen *AF4* Sequenz mit der murinen *Af4* Sequenz führte zu einer Pro-B-ALL in humanen CD34⁺ HSZ. Weshalb dieses artifizielle *MLL-Af4* Konstrukt im humanen Zellsystem die t(4;11) ALL besser rekapitulieren konnte als das humane *MLL-AF4* ist noch nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit wurde dazu die Rolle der pSer Domäne, in Bezug auf Unterschiede zwischen humaner und muriner Sequenz und daraus resultierende Folgen für die Zelle, untersucht. Beide Domänen unterscheiden sich durch das Fehlen von drei Aminosäuren in der humanen und zwei Aminosäuren in der murinen Sequenz (Abb. 3.2). Eine der fehlenden murinen Aminosäuren betrifft das SDE Motif, welches die Bindestelle für SL1 darstellt (Okuda *et al.*, 2015). In der gleichen Studie konnten der humanen pSer Domäne bereits immortalisierende Eigenschaften in myeloiden Vorläuferzellen

nachgewiesen werden. Eine weitere Studie von Lin *et al.* konnte zusätzlich die CHD Domäne des Af4 als verantwortlich für die favorisierte lymphatische Ausprägung im Modellsystem identifizieren (Lin *et al.*, 2017). Dabei wurden Mäusen MLL-CHD exprimierende Zellen transplantiert, welche dieselben B-ALL Eigenschaften vermittelten wie MLL-Af4. Ebenfalls gibt es Ansätze unter Verwendung eines chimären Mll-AF4, welche jedoch sowohl zu ALL, als auch zu AML führt und demnach in Bezug auf die Zelllinienausprägung weniger potent erscheint als die Nutzung eines *MLL-Af4* Fusionsgens (Krivtsov *et al.*, 2008b).

Diese Arbeit sollte einen weiteren Beitrag dazu leisten, die Unterschiede in den Mechanismen die die humane und der murine pSer Domäne des AF4 Parts des D11 im Modellsystem aufzudecken. Untersucht wurden dabei die Auswirkungen, die der Einfluss der Interaktion zwischen pSer Domäne und dem SL1 Komplex verursacht. Insgesamt zeigte sich dabei in Bezug auf die RiBi kein signifikanter Unterschied zwischen D11 mit humaner und muriner pSer Domäne. Ein deutlicher Unterschied hingegen, wurde bei den Lokalisationsstudien der Pol II ersichtlich. In Anwesenheit von D11 mit humaner pSer Domäne kam es zur verstärkten Bindung der Pol II am rRNA Promotor, welche bei D11m exprimierende Zellen nicht ersichtlich war, obwohl auch bei diesen Zellen eine Lokalisation der Pol II im Nukleolus zu sehen war (Abb. 3.13).

Während MLL-AF4 in 100 % aller *MLL-r*-Patienten zu detektieren ist, findet man das reziproke AF4-MLL nur in etwa 50 – 80 % der Fälle (Downing *et al.*, 1994; Kowarz *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2015). Obwohl auch für D4 ein onkogenes Potential gezeigt werden konnte, gilt D11 als Hauptauslöser der Leukämie (Bursen *et al.*, 2010). In aus *Funiculus umbilicalis* gewonnenen CD34⁺ HSZ reichte die alleinige Expression von D11 nicht aus um eine ALL zu induzieren (Montes *et al.*, 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder eine weitere Mutation, bzw. das reziproke D4 notwendig gewesen wären, oder aber die Ursprungszelle nicht korrekt gewählt wurde. Hinweise auf die Ursprungszelle der t(4;11) Leukämie lieferte eine Studie von Agraz-Doblas *et al.* (Agraz-Doblas *et al.*, 2019). Durch RNA-Sequenzierung konnte auf Transkriptomebene eine Ähnlichkeit zwischen Patientenzellen mit t(4;11) B-Zell-ALL und fetalen Leber-HSZ festgestellt werden. In derselben Studie konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der Expression von D4 und einem damit zusammenhängendem weniger schwerem Verlauf der t(4;11) Leukämie festgestellt werden. Des Weiteren ging die Expression von D4 mit einer erhöhten Expression an *HOXA*-Genen einher. Diese Beobachtung passt zu vorherigen Studien die bereits zeigen konnten, dass eine erhöhte *HOXA*-Expression mit einem leichteren Verlauf und einem niedrigeren Risiko eines Rückfalls korrelieren (Trentin *et al.*, 2009; Stam *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). Dass möglicherweise die Kooperation zwischen D4 und D11, ggf. auch nur im Anfangsstadium der Leukämie eine Rolle spielen könnte wurde von unserem

Arbeitskreis untersucht (Daten von Alexander Wilhelm; *Oncogene* 2021 *accepted*). Dabei zeigte die Expression eines stabilen *D11* und eines transienten *D4* eine verstärkte Deregulierung der Genexpression in MACE Sequenzierungsversuchen. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten MACE Experimente mit stabil exprimierten *D4* und *D11* belegen den kooperativen Effekt beider Fusionsgenen (Abb. 3.7-9).

Die Fülle und Diversität an verwendeten *MLL-r*-Modellsystemen trägt zur Diskussion über kontroverse Ergebnisse bei und stellt sich als nachteilig für die Forschung dar. Die inzwischen vermehrte Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems verspricht auch die *MLL-r*-Forschung, in Bezug auf die Verbesserung und Generierung akkuraterer Modellsysteme, zu revolutionieren (Ottersbach *et al.*, 2018).

5 Literaturverzeichnis

- ABATE-SHEN, C. (2002) Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature Reviews. Cancer* **2**, 777–785.
- ABRAHAM, K.J., KHOSRAVIANI, N., CHAN, J.N.Y., GORTHI, A., SAMMAN, A., ZHAO, D.Y., WANG, M., BOKROS, M., VIDYA, E., OSTROWSKI, L.A., OSHIDARI, R., PIETROBON, V., PATEL, P.S., ALGOUNEH, A., SINGHANIA, R., ET AL. (2020) Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. *Nature* **585**, 298–302.
- ADELMAN, K. & HENRIQUES, T. (2018) Transcriptional speed bumps revealed in high resolution. *Nature* **560**, 560–561.
- AGRAZ-DOBLAS, A., BUENO, C., BASHFORD-ROGERS, R., ROY, A., SCHNEIDER, P., BARDINI, M., BALLERINI, P., CAZZANIGA, G., MORENO, T., REVILLA, C., GUT, M., VALSECCHI, M.G., ROBERTS, I., PIETERS, R., DE LORENZO, P., ET AL. (2019) Unraveling the cellular origin and clinical prognostic markers of infant B-cell acute lymphoblastic leukemia using genome-wide analysis. *Haematologica* **104**, 1176–1188.
- ALI, M., HOM, R.A., BLAKESLEE, W., IKENOUE, L. & KUTATELADZE, T.G. (2014) Diverse functions of PHD fingers of the MLL/KMT2 subfamily. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1843**, 366–371.
- ALLEN, M.D., GRUMMITT, C.G., HILCENKO, C., MIN, S.Y., TONKIN, L.M., JOHNSON, C.M., FREUND, S.M., BYCROFT, M. & WARREN, A.J. (2006) Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase. *The EMBO journal* **25**, 4503–4512.
- ANDERSSON, A.K., MA, J., WANG, J., CHEN, X., GEDMAN, A.L., DANG, J., NAKITANDWE, J., HOLMFELDT, L., PARKER, M., EASTON, J., HUETHER, R., KRIWACKI, R., RUSCH, M., WU, G., LI, Y., ET AL. (2015) The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nature Genetics* **47**, 330–337.
- ANTONCHUK, J., SAUVAGEAU, G. & HUMPHRIES, R.K. (2002) HOXB4-Induced Expansion of Adult Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Cell* **109**, 39–45.
- APLAN, P.D., CHERVINSKY, D.S., STANULLA, M. & BURHANS, W.C. (1996) Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* **87**, 2649–2658.
- APRIKIAN, P., MOOREFIELD, B. & REEDER, R.H. (2001) New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4847–4855.

- ARABI, A., WU, S., RIDDERSTRÅLE, K., BIERHOFF, H., SHIUE, C., FATYOL, K., FAHLÉN, S., HYDBRING, P., SÖDERBERG, O., GRUMMT, I., LARSSON, L.-G. & WRIGHT, A.P.H. (2005) c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nature Cell Biology* **7**, 303–310.
- ARGIROPOULOS, B. & HUMPHRIES, R.K. (2007) Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**, 6766–6776.
- ARMISTEAD, J. & TRIGGS-RAINE, B. (2014) Diverse diseases from a ubiquitous process: The ribosomopathy paradox. *FEBS Letters* **588**, 1491–1500.
- ARTINGER, E.L. & ERNST, P. (2013) Cell context in the control of self-renewal and proliferation regulated by *MLL1*. *Cell Cycle* **12**, 2969–2972.
- AYTON, P.M. & CLEARY, M.L. (2001) Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* **20**, 5695–5707.
- BALGOBIND, B.V., RAIMONDI, S.C., HARBOTT, J., ZIMMERMANN, M., ALONZO, T.A., AUVRIGNON, A., BEVERLOO, H.B., CHANG, M., CREUTZIG, U., DWORZAK, M.N., FORESTIER, E., GIBSON, B., HASLE, H., HARRISON, C.J., HEEREMA, N.A., ET AL. (2009) Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* **114**, 2489–2496.
- BANNISTER, A.J. & KOUZARIDES, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641–643.
- BARABÉ, F., KENNEDY, J.A., HOPE, K.J. & DICK, J.E. (2007) Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 600–604.
- BARDINI, M., GALBIATI, M., LETTIERI, A., BUNGARO, S., GORLETTA, T.A., BIONDI, A. & CAZZANIGA, G. (2011) Implementation of array based whole-genome high-resolution technologies confirms the absence of secondary copy-number alterations in MLL-AF4-positive infant ALL patients. *Leukemia* **25**, 175–178.
- BARDINI, M., WOLL, P.S., CORRAL, L., LUC, S., WITTMANN, L., MA, Z., LO NIGRO, L., BASSO, G., BIONDI, A., CAZZANIGA, G. & JACOBSEN, S.E.W. (2015) Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. *Leukemia* **29**, 38–50.
- BARNES, B., KRAYWINKEL, K., NOWOSSADECK, E., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A. & WOLF, U. (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch Institut.

- BARRETT, N.A., MALOUF, C., KAPENI, C., BACON, W.A., GIOTOPOULOS, G., JACOBSEN, S.E.W., HUNTLY, B.J. & OTTERSBAACH, K. (2016) Mll-AF4 Confers Enhanced Self-Renewal and Lymphoid Potential during a Restricted Window in Development. *Cell Reports* **16**, 1039–1054.
- BAZETT-JONES, D.P., LEBLANC, B., HERFORT, M. & MOSS, T. (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science (New York, N.Y.)* **264**, 1134–1137.
- BECKER, A.J., MCCULLOCH, E.A. & TILL, J.E. (1963) Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* **197**, 452–454.
- BECKMANN, H., CHEN, J.L., O'BRIEN, T. & TJIAN, R. (1995) Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 1506–1509.
- BECKOUE, F., LABARRE-MARIOTTE, S., ALBERT, B., IMAZAWA, Y., WERNER, M., GADAL, O., NOGI, Y. & THURIAUX, P. (2008) Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 1596–1605.
- BELL, S.P., LEARNED, R.M., JANTZEN, H.M. & TJIAN, R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **241**, 1192–1197.
- BENE, M.C., CASTOLDI, G., KNAPP, W., LUDWIG, W.D., MATUTES, E., ORFAO, A. & VAN'T VEER, M.B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783–1786.
- BENEDIKT, A., BALTRUSCHAT, S., SCHOLZ, B., BURSEN, A., ARREY, T.N., MEYER, B., VARAGNOLO, L., MULLER, A.M., KARAS, M., DINGERMANN, T. & MARSCHALEK, R. (2011) The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* **25**, 135–144.
- BERNECKY, C., PLITZKO, J.M. & CRAMER, P. (2017) Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nature Structural & Molecular Biology* **24**, 809–815.
- BIBERFELD, P. (1971) Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin (PHA). A light and electron microscopic study. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Supplement* **223**, Suppl 223:1–70.

- BIERHOFF, H., DUNDR, M., MICHELS, A.A. & GRUMMT, I. (2008) Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 4988–4998.
- BIRCH, J.L. & ZOMERDIJK, J.C.B.M. (2008) Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. *Biochemical Society Transactions* **36**, 619–624.
- BITOUN, E., OLIVER, P.L. & DAVIES, K.E. (2007) The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Human Molecular Genetics* **16**, 92–106.
- BLOBEL, G.A., KADAUKE, S., WANG, E., LAU, A.W., ZUBER, J., CHOU, M.M. & VAKOC, C.R. (2009) A reconfigured pattern of MLL occupancy within mitotic chromatin promotes rapid transcriptional reactivation following mitotic exit. *Molecular Cell* **36**, 970–983.
- BODEM, J., DOBREVA, G., HOFFMANN-ROHRER, U., IBEN, S., ZENTGRAF, H., DELIUS, H., VINGRON, M. & GRUMMT, I. (2000) TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO reports* **1**, 171–175.
- BOSSE, A., ZÜLCH, A., BECKER, M.B., TORRES, M., GÓMEZ-SKARMETA, J.L., MODOLELL, J. & GRUSS, P. (1997) Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mechanisms of Development* **69**, 169–181.
- BOTBOL, Y., RAGHAVENDRA, N.K., RAHMAN, S., ENGELMAN, A. & LAVIGNE, M. (2008) Chromatinized templates reveal the requirement for the LEDGF/p75 PWWP domain during HIV-1 integration in vitro. *Nucleic Acids Research* **36**, 1237–1246.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R.L., TORRE, L.A. & JEMAL, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**, 394–424.
- BREEN, T.R. & HARTE, P.J. (1993) Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each. *Development (Cambridge, England)* **117**, 119–134.
- BROEKER, P.L., HARDEN, A., ROWLEY, J.D. & ZELEZNIK-LE, N. (1996) The mixed lineage leukemia (MLL) protein involved in 11q23 translocations contains

- a domain that binds cruciform DNA and scaffold attachment region (SAR) DNA. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **211**, 259–268.
- BROSS, K. & KRONE, W. (1972) On the number of ribosomal RNA genes in man. *Humangenetik* **14**, 137–141.
- BRUNEAU, B.G., BAO, Z.Z., TANAKA, M., SCHOTT, J.J., IZUMO, S., CEPKO, C.L., SEIDMAN, J.G. & SEIDMAN, C.E. (2000) Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Developmental Biology* **217**, 266–277.
- BUDDE, A. & GRUMMT, I. (1999) p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* **18**, 1119–1124.
- BUECHELE, C., BREESE, E.H., SCHNEIDAWIND, D., LIN, C.-H., JEONG, J., DUQUE-AFONSO, J., WONG, S.H.K., SMITH, K.S., NEGRIN, R.S., PORTEUS, M. & CLEARY, M.L. (2015) MLL leukemia induction by genome editing of human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* **126**, 1683–1694.
- BUENO, C., CALERO-NIETO, F.J., WANG, X., VALDÉS-MAS, R., GUTIÉRREZ-AGÜERA, F., ROCA-HO, H., AYLON, V., REAL, P.J., ARAMBILET, D., ESPINOSA, L., TORRES-RUIZ, R., AGRAZ-DOBLAS, A., VARELA, I., DE BOER, J., BIGAS, A., ET AL. (2019) Enhanced hemato-endothelial specification during human embryonic differentiation through developmental cooperation between *AF4-MLL* and *MLL-AF4* fusions. *Haematologica* **104**, 1189–1201.
- BURSEN, A., MORITZ, S., GAUSSMANN, A., MORITZ, S., DINGERMAN, T. & MARSCHALEK, R. (2004) Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* **23**, 6237–6249.
- BURSEN, A., SCHWABE, K., RÜSTER, B., HENSCHLER, R., RUTHARDT, M., DINGERMAN, T. & MARSCHALEK, R. (2010) The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* **115**, 3570–3579.
- BURTON, Z.F. (2014) The Old and New Testaments of gene regulation: Evolution of multi-subunit RNA polymerases and co-evolution of eukaryote complexity with the RNAP II CTD. *Transcription* **5**, e28674.
- BUSCH, H. & SMETANA, K. (1970) The Nucleolus. *Academic Press, New York*.
- BUSKE, C., FEURING-BUSKE, M., ABRAMOVICH, C., SPIEKERMANN, K., EAVES, C.J., COULOMBEL, L., SAUVAGEAU, G., HOGGE, D.E. & HUMPHRIES, R.K. (2002) Deregulated expression of *HOXB4* enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* **100**, 862–868.

- BUTLER, L.H., SLANY, R., CUI, X., CLEARY, M.L. & MASON, D.Y. (1997) The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* **89**, 3361–3370.
- BYWATER, M.J., POORTINGA, G., SANIJ, E., HEIN, N., PECK, A., CULLINANE, C., WALL, M., CLUSE, L., DRYGIN, D., ANDERES, K., HUSER, N., PROFFITT, C., BLIESATH, J., HADDACH, M., SCHWAEBE, M.K., ET AL. (2012) Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* **22**, 51–65.
- CABURET, S. (2005) Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Research* **15**, 1079–1085.
- CAI, X., GAO, L., TENG, L., GE, J., OO, Z.M., KUMAR, A.R., GILLILAND, D.G., MASON, P.J., TAN, K. & SPECK, N.A. (2015) Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 165–177.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, LEY, T.J., MILLER, C., DING, L., RAPHAEL, B.J., MUNGALL, A.J., ROBERTSON, A.G., HOADLEY, K., TRICHE, T.J., LAIRD, P.W., BATY, J.D., FULTON, L.L., FULTON, R., HEATH, S.E., KALICKI-VEIZER, J., ET AL. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* **368**, 2059–2074.
- CAO, F., CHEN, Y., CIERPICKI, T., LIU, Y., BASRUR, V., LEI, M. & DOU, Y. (2010) An Ash2L/RbBP5 Heterodimer Stimulates the MLL1 Methyltransferase Activity through Coordinated Substrate Interactions with the MLL1 SET Domain. *PLoS ONE* **5**, e14102.
- CAO, F., TOWNSEND, E.C., KARATAS, H., XU, J., LI, L., LEE, S., LIU, L., CHEN, Y., OUILLETTE, P., ZHU, J., HESS, J.L., ATADJA, P., LEI, M., QIN, Z.S., MALEK, S., ET AL. (2014) Targeting MLL1 H3K4 Methyltransferase Activity in Mixed-Lineage Leukemia. *Molecular Cell* **53**, 247–261.
- CATEZ, F., DALLA VENEZIA, N., MARCEL, V., ZORBAS, C., LAFONTAINE, D.L.J. & DIAZ, J.-J. (2019) Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology* **159**, 74–81.
- CAVANAUGH, A.H., HIRSCHLER-LASZKIEWICZ, I., HU, Q., DUNDR, M., SMINK, T., MISTELI, T. & ROTHBLUM, L.I. (2002) Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 27423–27432.
- ČERMÁKOVÁ, K., TESINA, P., DEMEULEMEESTER, J., EL ASHKAR, S., MÉREAU, H., SCHWALLER, J., ŘEZAČOVÁ, P., VEVERKA, V. & DE RIJCK, J. (2014) Validation and Structural Characterization of the LEDGF/p75–MLL Interface as a

- New Target for the Treatment of MLL-Dependent Leukemia. *Cancer Research* **74**, 5139–5151.
- CHAN, J.C., HANNAN, K.M., RIDDELL, K., NG, P.Y., PECK, A., LEE, R.S., HUNG, S., ASTLE, M.V., BYWATER, M., WALL, M., POORTINGA, G., JASTRZEBSKI, K., SHEPPARD, K.E., HEMMINGS, B.A., HALL, M.N., ET AL. (2011) AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Science Signaling* **4**, ra56.
- CHAO, S.-H. & PRICE, D.H. (2001) Flavopiridol Inactivates P-TEFb and Blocks Most RNA Polymerase II Transcription in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 31793–31799.
- CHEN, W., LI, Q., HUDSON, W.A., KUMAR, A., KIRCHHOF, N. & KERSEY, J.H. (2006) A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* **108**, 669–677.
- CHEN, Y. & CRAMER, P. (2019) Structure of the super-elongation complex subunit AFF4 C-terminal homology domain reveals requirements for AFF homo- and heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 10663–10673.
- CHENG, B. & PRICE, D.H. (2007) Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 21901–21912.
- CHEUTIN, T., O'DONOHUE, M.-F., BEORCHIA, A., VANDELAER, M., KAPLAN, H., DEFÉVER, B., PLOTON, D. & THIRY, M. (2002) Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *Journal of Cell Science* **115**, 3297–3307.
- CMARKO, D., VERSCHURE, P.J., ROTHBLUM, L.I., HERNANDEZ-VERDUN, D., AMALRIC, F., VAN DRIEL, R. & FAKAN, S. (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochemistry and Cell Biology* **113**, 181–187.
- COMAI, L., TANESE, N. & TJIAN, R. (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* **68**, 965–976.
- COMAI, L., ZOMERDIJK, J.C., BECKMANN, H., ZHOU, S., ADMON, A. & TJIAN, R. (1994) Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 1966–1972.

- CONCONI, A., WIDMER, R.M., KOLLER, T. & SOGO, J.M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**, 753–761.
- CORNELISON, R., DOBBIN, Z.C., KATRE, A.A., JEONG, D.H., ZHANG, Y., CHEN, D., PETROVA, Y., LLANEZA, D.C., STEG, A.D., PARSONS, L., SCHNEIDER, D.A. & LANDEN, C.N. (2017) Targeting RNA-Polymerase I in Both Chemosensitive and Chemoresistant Populations in Epithelial Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* **23**, 6529–6540.
- CORRAL, J., LAVENIR, I., IMPEY, H., WARREN, A.J., FORSTER, A., LARSON, T.A., BELL, S., MCKENZIE, A.N., KING, G. & RABBITS, T.H. (1996) An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**, 853–861.
- DAGOGO-JACK, I. & SHAW, A.T. (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **15**, 81–94.
- DAIGLE, S.R., OLHAVA, E.J., THERKELSEN, C.A., BASAVAPATHRUNI, A., JIN, L., BORIACK-SJODIN, P.A., ALLAIN, C.J., KLAUS, C.R., RAIMONDI, A., SCOTT, M.P., WATERS, N.J., CHESWORTH, R., MOYER, M.P., COPELAND, R.A., RICHON, V.M., ET AL. (2013) Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* **122**, 1017–1025.
- DANNHEISIG, D.P., BÄCHLE, J., TASIC, J., KEIL, M. & PFISTER, A.S. (2021) The Wnt/ β -Catenin Pathway is Activated as a Novel Nucleolar Stress Response. *Journal of Molecular Biology* **433**, 166719.
- DAWSON, M.A., PRINJHA, R.K., DITTMANN, A., GIOTOPOULOS, G., BANTSCHIEFF, M., CHAN, W.-I., ROBSON, S.C., CHUNG, C., HOPF, C., SAVITSKI, M.M., HUTHMACHER, C., GUDGIN, E., LUGO, D., BEINKE, S., CHAPMAN, T.D., ET AL. (2011) Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* **478**, 529–533.
- DE WAELE, M., RENMANS, W., VANDER GUCHT, K., JOCHMANS, K., SCHOTS, R., OTTEN, J., TRULLEMANS, F., LACOR, P. & VAN RIET, I. (2001) Growth factor receptor profile of CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and in their normal bone marrow counterparts. *European Journal of Haematology* **66**, 178–187.
- DENISSOV, S., VAN DRIEL, M., VOIT, R., HEKKELMAN, M., HULSEN, T., HERNANDEZ, N., GRUMMT, I., WEHRENS, R. & STUNNENBERG, H. (2007) Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *The EMBO journal* **26**, 944–954.

- DENISSOV, S., LESSARD, F., MAYER, C., STEFANOVSKY, V., VAN DRIEL, M., GRUMMT, I., MOSS, T. & STUNNENBERG, H.G. (2011) A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO reports* **12**, 231–237.
- DERENZINI, M., TRERÈ, D., PESSION, A., GOVONI, M., SIRRI, V. & CHIECO, P. (2000) Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of Pathology* **191**, 181–186.
- DERENZINI, M., TRERÈ, D., PESSION, A., MONTANARO, L., SIRRI, V. & OCHS, R.L. (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *The American Journal of Pathology* **152**, 1291–1297.
- DESCHAMPS, J. & VAN NES, J. (2005) Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development (Cambridge, England)* **132**, 2931–2942.
- DESHPANDE, A.J., DESHPANDE, A., SINHA, A.U., CHEN, L., CHANG, J., CIHAN, A., FAZIO, M., CHEN, C., ZHU, N., KOCHER, R., DZHEKIEVA, L., IBAÑEZ, G., DIAS, S., BANKA, D., KRIVTSOV, A., ET AL. (2014) AF10 Regulates Progressive H3K79 Methylation and HOX Gene Expression in Diverse AML Subtypes. *Cancer Cell* **26**, 896–908.
- DIMARTINO, J.F. & CLEARY, M.L. (1999) Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *British Journal of Haematology* **106**, 614–626.
- DJABALI, M., SELLERI, L., PARRY, P., BOWER, M., YOUNG, B.D. & EVANS, G.A. (1992) A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nature Genetics* **2**, 113–118.
- DONADIEU, J., LEBLANC, T., BADER MEUNIER, B., BARKAOU, M., FENNETEAU, O., BERTRAND, Y., MAIER-REDELSPERGER, M., MICHEAU, M., STEPHAN, J.L., PHILLIPE, N., BORDIGONI, P., BABIN-BOILLETOT, A., BENSALD, P., MANEL, A.M., VILMER, E., ET AL. (2005) Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica* **90**, 45–53.
- DOU, Y., MILNE, T.A., RUTHENBURG, A.J., LEE, S., LEE, J.W., VERDINE, G.L., ALLIS, C.D. & ROEDER, R.G. (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 713–719.
- DOU, Y., MILNE, T.A., TACKETT, A.J., SMITH, E.R., FUKUDA, A., WYSOCKA, J., ALLIS, C.D., CHAIT, B.T., HESS, J.L. & ROEDER, R.G. (2005) Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**, 873–885.

- DOULATOV, S., NOTTA, F., LAURENTI, E. & DICK, J.E. (2012) Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136.
- DOWNING, J.R., HEAD, D.R., RAIMONDI, S.C., CARROLL, A.J., CURCIO-BRINT, A.M., MOTRONI, T.A., HULSHOF, M.G., PULLEN, D.J. & DOMER, P.H. (1994) The der(11)-encoded MLL/AF-4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23)-containing acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **83**, 330–335.
- DRYGIN, D., LIN, A., BLIESATH, J., HO, C.B., O'BRIEN, S.E., PROFFITT, C., OMORI, M., HADDACH, M., SCHWAEBE, M.K., SIDDIQUI-JAIN, A., STREINER, N., QUIN, J.E., SANIJ, E., BYWATER, M.J., HANNAN, R.D., ET AL. (2011) Targeting RNA Polymerase I with an Oral Small Molecule CX-5461 Inhibits Ribosomal RNA Synthesis and Solid Tumor Growth. *Cancer Research* **71**, 1418–1430.
- EBERHARD, D., TORA, L., EGLY, J.M. & GRUMMT, I. (1993) A TBP-containing multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucleic Acids Research* **21**, 4180–4186.
- EIDAHL, J.O., CROWE, B.L., NORTH, J.A., MCKEE, C.J., SHKRIABAI, N., FENG, L., PLUMB, M., GRAHAM, R.L., GORELICK, R.J., HESS, S., POIRIER, M.G., FOSTER, M.P. & KVARATSKHELIA, M. (2013) Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes. *Nucleic Acids Research* **41**, 3924–3936.
- EILERS, M., PICARD, D., YAMAMOTO, K.R. & BISHOP, J.M. (1989) Chimaeras of Myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* **340**, 66–68.
- EMERENCIANO, M., MEYER, C., MANSUR, M.B., MARSCHALEK, R., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., & BRAZILIAN COLLABORATIVE STUDY GROUP OF INFANT ACUTE LEUKAEMIA (2013) The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *British Journal of Haematology* **161**, 224–236.
- ERDMANN, F., KAATSCH, P., GRABOW, D. & SPIX, C. (2020) German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2019 (1980–2019). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
- ERFURTH, F., HEMENWAY, C.S., DE ERKENEZ, A.C. & DOMER, P.H. (2004) MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* **18**, 92–102.
- FABER, J., KRIVTSOV, A.V., STUBBS, M.C., WRIGHT, R., DAVIS, T.N., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M., ZWAAN, C.M., KUNG, A.L. & ARMSTRONG, S.A. (2009)

- HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* **113**, 2375–2385.
- FAIR, K., ANDERSON, M., BULANOVA, E., MI, H., TROPSCHUG, M. & DIAZ, M.O. (2001) Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3589–3597.
- FELIX, C.A. (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1400**, 233–255.
- FELIX, C.A. (2001) Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Medical and Pediatric Oncology* **36**, 525–535.
- FETHERSTON, J., WERNER, E. & PATTERSON, R. (1984) Processing of the external transcribed spacer of murine rRNA and site of action of actinomycin D. *Nucleic Acids Research* **12**, 7187–7198.
- FILIPPAKOPOULOS, P., QI, J., PICAUD, S., SHEN, Y., SMITH, W.B., FEDOROV, O., MORSE, E.M., KEATES, T., HICKMAN, T.T., FELLETAR, I., PHILPOTT, M., MUNRO, S., MCKEOWN, M.R., WANG, Y., CHRISTIE, A.L., ET AL. (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067–1073.
- FONG, C.Y., GILAN, O., LAM, E.Y.N., RUBIN, A.F., FTOUNI, S., TYLER, D., STANLEY, K., SINHA, D., YEH, P., MORISON, J., GIOTOPOULOS, G., LUGO, D., JEFFREY, P., LEE, S.C.-W., CARPENTER, C., ET AL. (2015) BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature* **525**, 538–542.
- FORSBERG, E.C., PROHASKA, S.S., KATZMAN, S., HEFFNER, G.C., STUART, J.M. & WEISSMAN, I.L. (2005) Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS genetics* **1**, e28.
- FRENCH, S.L., OSHEIM, Y.N., CIOCI, F., NOMURA, M. & BEYER, A.L. (2003) In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1558–1568.
- FRESTEDT, J.L., HILDEN, J.M., MOORE, R.O. & KERSEY, J.H. (1996) Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **12**, 147–149.
- FRIEDRICH, J.K., PANOV, K.I., CABART, P., RUSSELL, J. & ZOMERDIJK, J.C.B.M. (2005) TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 29551–29558.

- GADAL, O., LABARRE, S., BOSCHIERO, C. & THURIAUX, P. (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *The EMBO journal* **21**, 5498–5507.
- GALE, K.B., FORD, A.M., REPP, R., BORKHARDT, A., KELLER, C., EDEN, O.B. & GREAVES, M.F. (1997) Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13950–13954.
- GANLEY, A.R.D., HAYASHI, K., HORIUCHI, T. & KOBAYASHI, T. (2005) Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 11787–11792.
- GARDNER, R., WU, D., CHERIAN, S., FANG, M., HANAFI, L.-A., FINNEY, O., SMITHERS, H., JENSEN, M.C., RIDDELL, S.R., MALONEY, D.G. & TURTLE, C.J. (2016) Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* **127**, 2406–2410.
- GENTILELLA, A., MORÓN-DURAN, F.D., FUENTES, P., ZWEIG-ROCHA, G., RIAÑO-CANALIAS, F., PELLETIER, J., RUIZ, M., TURÓN, G., CASTAÑO, J., TAULER, A., BUENO, C., MENÉNDEZ, P., KOZMA, S.C. & THOMAS, G. (2017) Autogenous Control of 5'TOP mRNA Stability by 40S Ribosomes. *Molecular Cell* **67**, 55–70.e4.
- GILLERT, E., LEIS, T., REPP, R., REICHEL, M., HÖSCH, A., BREITENLOHNER, I., ANGERMÜLLER, S., BORKHARDT, A., HARBOTT, J., LAMPERT, F., GRIESINGER, F., GREIL, J., FEY, G.H. & MARSCHALEK, R. (1999) A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* **18**, 4663–4671.
- GILMOUR, D.S. & LIS, J.T. (1986) RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 3984–3989.
- GOESSENS, G. (1984) Nucleolar structure. *International Review of Cytology* **87**, 107–158.
- GORSKI, J.J., PATHAK, S., PANOV, K., KASCIUKOVIC, T., PANOVA, T., RUSSELL, J. & ZOMERDIJK, J.C.B.M. (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *The EMBO journal* **26**, 1560–1568.

- GORSKI, S.A., SNYDER, S.K., JOHN, S., GRUMMT, I. & MISTELI, T. (2008) Modulation of RNA Polymerase Assembly Dynamics in Transcriptional Regulation. *Molecular Cell* **30**, 486–497.
- GRANDORI, C., GOMEZ-ROMAN, N., FELTON-EDKINS, Z.A., NGOUENET, C., GALLOWAY, D.A., EISENMAN, R.N. & WHITE, R.J. (2005) c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature Cell Biology* **7**, 311–318.
- GREAVES, M. (2005) In utero origins of childhood leukaemia. *Early Human Development* **81**, 123–129.
- GREAVES, M.F. (1996) Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* **10**, 372–377.
- GRIMWADE, D., HILLS, R.K., MOORMAN, A.V., WALKER, H., CHATTERS, S., GOLDSTONE, A.H., WHEATLEY, K., HARRISON, C.J., BURNETT, A.K., & ON BEHALF OF THE NATIONAL CANCER RESEARCH INSTITUTE ADULT LEUKAEMIA WORKING GROUP (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365.
- GRUMMT, I. & GRUMMT, F. (1976) Control of nucleolar RNA synthesis by the intracellular pool sizes of ATP and GTP. *Cell* **7**, 447–453.
- GRUMMT, I. & PIKAARD, C.S. (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **4**, 641–649.
- GRUMMT, I., SMITH, V.A. & GRUMMT, F. (1976) Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* **7**, 439–445.
- GU, Y., NAKAMURA, T., ALDER, H., PRASAD, R., CANAANI, O., CIMINO, G., CROCE, C.M. & CANAANI, E. (1992) 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* **71**, 701–708.
- GUO, H.-B. & GUO, H. (2007) Mechanism of histone methylation catalyzed by protein lysine methyltransferase SET7/9 and origin of product specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8797–8802.
- GUO, S., YAMAGUCHI, Y., SCHILBACH, S., WADA, T., LEE, J., GODDARD, A., FRENCH, D., HANDA, H. & ROSENTHAL, A. (2000) A regulator of transcriptional elongation controls vertebrate neuronal development. *Nature* **408**, 366–369.

- HADJIOLOV, A.A. (1985) *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. Springer Vienna, Vienna.
- HALTINER, M.M., SMALE, S.T. & TJIAN, R. (1986) Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 227–235.
- HANSON, R.D., HESS, J.L., YU, B.D., ERNST, P., VAN LOHUIZEN, M., BERNS, A., VAN DER LUGT, N.M., SHASHIKANT, C.S., RUDDLE, F.H., SETO, M. & KORSMEYER, S.J. (1999) Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14372–14377.
- HASLE, H., CLEMMENSEN, I.H. & MIKKELSEN, M. (2000) Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet (London, England)* **355**, 165–169.
- HASSAN, H.T. & REES, J. (1990) Triple combination of retinoic acid plus actinomycin D plus dimethylformamide induces differentiation of human acute myeloid leukaemic blasts in primary culture. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **26**, 26–30.
- HE, N., LIU, M., HSU, J., XUE, Y., CHOU, S., BURLINGAME, A., KROGAN, N.J., ALBER, T. & ZHOU, Q. (2010) HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Molecular Cell* **38**, 428–438.
- HEIN, N., CAMERON, D.P., HANNAN, K.M., NGUYEN, N.-Y.N., FONG, C.Y., SORNIKOM, J., WALL, M., PAVY, M., CULLINANE, C., DIESCH, J., DEVLIN, J.R., GEORGE, A.J., SANIJ, E., QUIN, J., POORTINGA, G., ET AL. (2017) Inhibition of Pol I transcription treats murine and human AML by targeting the leukemia-initiating cell population. *Blood* **129**, 2882–2895.
- HEINTZMAN, N.D., STUART, R.K., HON, G., FU, Y., CHING, C.W., HAWKINS, R.D., BARRERA, L.O., VAN CALCAR, S., QU, C., CHING, K.A., WANG, W., WENG, Z., GREEN, R.D., CRAWFORD, G.E. & REN, B. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics* **39**, 311–318.
- HEIX, J. & GRUMMT, I. (1995) Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**, 652–656.
- HEIX, J., ZOMERDIJK, J.C., RAVANPAY, A., TJIAN, R. & GRUMMT, I. (1997) Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation

- factor TIF-IB/SL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1733–1738.
- HEMPEL, W.M., CAVANAUGH, A.H., HANNAN, R.D., TAYLOR, L. & ROTHBLUM, L.I. (1996) The species-specific RNA polymerase I transcription factor SL-1 binds to upstream binding factor. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 557–563.
- HERDMAN, C., MARS, J.-C., STEFANOVSKY, V.Y., TREMBLAY, M.G., SABOURIN-FELIX, M., LINDSAY, H., ROBINSON, M.D. & MOSS, T. (2017) A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS genetics* **13**, e1006899.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., ROUSSEL, P. & GÉBRANE-YOUNÈS, J. (2002) Emerging concepts of nucleolar assembly. *Journal of Cell Science* **115**, 2265–2270.
- HETMAN, M. & PIETRZAK, M. (2012) Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends in Neurosciences* **35**, 305–314.
- HIRSCHLER-LASZKIEWICZ, I., CAVANAUGH, A.H., MIRZA, A., LUN, M., HU, Q., SMINK, T. & ROTHBLUM, L.I. (2003) Rrn3 becomes inactivated in the process of ribosomal DNA transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 18953–18959.
- HOELZER, D. & GOKBUGER, N. (2002) Diagnostik und Therapie der akuten lymphatischen Leukaemia des Erwachsenen. *Onkologie*.
- HOLLSTEIN, U. (1974) Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chemical Reviews* **74**, 625–652.
- HONDA, R., TANAKA, H. & YASUDA, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* **420**, 25–27.
- HSIEH, J.J.-D., CHENG, E.H.-Y. & KORSMEYER, S.J. (2003) Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**, 293–303.
- HU, Y.-L., PASSEGUÉ, E., FONG, S., LARGMAN, C. & LAWRENCE, H.J. (2007) Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* **109**, 4732–4738.
- HUH, Y.O. & IBRAHIM, S. (2000) Immunophenotypes in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **14**, 1251–1265.
- ISAACS, A.M., OLIVER, P.L., JONES, E.L., JEANS, A., POTTER, A., HOVIK, B.H., NOLAN, P.M., VIZOR, L., GLENISTER, P., SIMON, A.K., GRAY, I.C., SPURR, N.K., BROWN, S.D.M., HUNTER, A.J. & DAVIES, K.E. (2003) 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* **23**, 1631–1637.
- ISNARD, P., CORÉ, N., NAQUET, P. & DJABALI, M. (2000) Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* **96**, 705–710.
- IYER, N.G., OZDAG, H. & CALDAS, C. (2004) p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**, 4225–4231.
- JANTZEN, H.M., CHOW, A.M., KING, D.S. & TJIAN, R. (1992) Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes & Development* **6**, 1950–1963.
- JAVED, S. & LANGLEY, S.E.M. (2014) Importance of HOX genes in normal prostate gland formation, prostate cancer development and its early detection. *BJU international* **113**, 535–540.
- JOSEPHS, H.W. (1936) ANAEMIA OF INFANCY AND EARLY CHILDHOOD: *Medicine* **15**, 307–451.
- JUDE, C.D., CLIMER, L., XU, D., ARTINGER, E., FISHER, J.K. & ERNST, P. (2007) Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* **1**, 324–337.
- JUNÉRA, H.R., MASSON, C., GÉRAUD, G. & HERNANDEZ-VERDUN, D. (1995) The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *Journal of Cell Science* **108** (Pt 11), 3427–3441.
- KAATSCH, P., GRABOW, D. & SPIX, C. (2018) German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2017 (1980–2016). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*.
- KALINA, T., FLORES-MONTERO, J., VAN DER VELDEN, V.H.J., MARTIN-AYUSO, M., BÖTTCHER, S., RITGEN, M., ALMEIDA, J., LHERMITTE, L., ASNAFI, V., MENDONÇA, A., DE TUTE, R., CULLEN, M., SEDEK, L., VIDRIALES, M.B., PÉREZ, J.J., ET AL. (2012) EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* **26**, 1986–2010.
- KALITA, K., MAKONCHUK, D., GOMES, C., ZHENG, J.-J. & HETMAN, M. (2008) Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry* **105**, 2286–2299.

- KANG, H., WILSON, C.S., HARVEY, R.C., CHEN, I.-M., MURPHY, M.H., ATLAS, S.R., BEDRICK, E.J., DEVIDAS, M., CARROLL, A.J., ROBINSON, B.W., STAM, R.W., VALSECCHI, M.G., PIETERS, R., HEEREMA, N.A., HILDEN, J.M., ET AL. (2012) Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* **119**, 1872–1881.
- KERMEKCHIEV, M., WORKMAN, J.L. & PIKAARD, C.S. (1997) Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5833–5842.
- KHARAS, M.G. & FRUMAN, D.A. (2005) ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Research* **65**, 2047–2053.
- KIRSTETTER, P., ANDERSON, K., PORSE, B.T., JACOBSEN, S.E.W. & NERLOV, C. (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature Immunology* **7**, 1048–1056.
- KLOBUSICKA, M., KUSENDA, J., STEVULOVA, L., KOVARIKOVA, A. & BABUSIKOVA, O. (2010) Possible prognostic value of nucleolar morphology in pathologic cells of B-chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* **57**, 429–437.
- KOBAYASHI, T. & GANLEY, A.R.D. (2005) Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science (New York, N.Y.)* **309**, 1581–1584.
- KOBERNA, K., MALÍNSKÝ, J., PLISS, A., MASATA, M., VECEROVA, J., FIALOVA, M., BEDNÁR, J. & RASKA, I. (2002) Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of 'Christmas trees' in situ. *The Journal of Cell Biology* **157**, 743–748.
- KOWARZ, E., BURMEISTER, T., LO NIGRO, L., JANSEN, M.W.J.C., DELABESSE, E., KLINGEBIEL, T., DINGERMAN, T., MEYER, C. & MARSCHALEK, R. (2007) Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* **21**, 1232–1238.
- KRIVTSOV, A.V., FENG, Z., LEMIEUX, M.E., FABER, J., VEMPATI, S., SINHA, A.U., XIA, X., JESNECK, J., BRACKEN, A.P., SILVERMAN, L.B., KUTOK, J.L., KUNG, A.L. & ARMSTRONG, S.A. (2008a) H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. *Cancer Cell* **14**, 355–368.
- KRIVTSOV, A.V., FENG, Z., LEMIEUX, M.E., FABER, J., VEMPATI, S., SINHA, A.U., XIA, X., JESNECK, J., BRACKEN, A.P., SILVERMAN, L.B., KUTOK, J.L., KUNG, A.L. & ARMSTRONG, S.A. (2008b) H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* **14**, 355–368.

- KROON, E., KROSL, J., THORSTEINSDOTTIR, U., BABAN, S., BUCHBERG, A.M. & SAUVAGEAU, G. (1998) Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO journal* **17**, 3714–3725.
- KÜHN, A., LÖSCHER, D. & MARSCHALEK, R. (2016) The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t(4;11)- specific cancer mechanism. *Oncotarget* **7**, 35341–35352.
- LAVAU, C. (1997) Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *The EMBO Journal* **16**, 4226–4237.
- LAWRENCE, M.G., OBINATA, D., SANDHU, S., SELTH, L.A., WONG, S.Q., PORTER, L.H., LISTER, N., POOK, D., PEZARO, C.J., GOODE, D.L., REBELLO, R.J., CLARK, A.K., PAPARGIRIS, M., VAN GRAMBERG, J., HANSON, A.R., ET AL. (2018) Patient-derived Models of Abiraterone- and Enzalutamide-resistant Prostate Cancer Reveal Sensitivity to Ribosome-directed Therapy. *European Urology* **74**, 562–572.
- LAZDINS, I.B., DELANNOY, M. & SOLLNER-WEBB, B. (1997) Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* **105**, 481–495.
- LEARNED, R.M., CORDES, S. & TJIAN, R. (1985) Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. *Molecular and Cellular Biology* **5**, 1358–1369.
- LEE, H.C., WANG, H., BALADANDAYUTHAPANI, V., LIN, H., HE, J., JONES, R.J., KUIATSE, I., GU, D., WANG, Z., MA, W., LIM, J., O'BRIEN, S., KEATS, J., YANG, J., DAVIS, R.E., ET AL. (2017) RNA Polymerase I Inhibition with CX-5461 as a Novel Therapeutic Strategy to Target MYC in Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* **177**, 80–94.
- LEE, J.H., VOO, K.S. & SKALNIK, D.G. (2001) Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 44669–44676.
- LEWIS, H., BIRNSTIEL, M., BROWN, D., GALL, J., PENMAN, S., PERRY, R. & VINCENT, W. (1966) Panel on ribosome biogenesis. *National Cancer Institute Monograph* **23**, 547–561.
- LI, J. & GILMOUR, D.S. (2013) Distinct mechanisms of transcriptional pausing orchestrated by GAGA factor and M1BP, a novel transcription factor. *The EMBO journal* **32**, 1829–1841.

- LI, X., LI, L., LI, Y., ZHAO, J., FAN, S. & WANG, L. (2016) CX-5461 induces autophagy and inhibits tumor growth via mammalian target of rapamycin-related signaling pathways in osteosarcoma. *OncoTargets and Therapy* **Volume 9**, 5985–5997.
- LIAU, M.C. & PERRY, R.P. (1969) Ribosome precursor particles in nucleoli. *The Journal of Cell Biology* **42**, 272–283.
- LIN, C., SMITH, E.R., TAKAHASHI, H., LAI, K.C., MARTIN-BROWN, S., FLORENS, L., WASHBURN, M.P., CONAWAY, J.W., CONAWAY, R.C. & SHILATIFARD, A. (2010) AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Molecular Cell* **37**, 429–437.
- LIN, S., LUO, R.T., PTASINSKA, A., KERRY, J., ASSI, S.A., WUNDERLICH, M., IMAMURA, T., KABERLEIN, J.J., RAYES, A., ALTHOFF, M.J., ANASTASI, J., O'BRIEN, M.M., MEETEI, A.R., MILNE, T.A., BONIFER, C., ET AL. (2016) Instructive Role of MLL-Fusion Proteins Revealed by a Model of t(4;11) Pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer cell* **30**, 737–749.
- LIN, S., LUO, R.T., SHRESTHA, M., THIRMAN, M.J. & MULLOY, J.C. (2017) The full transforming capacity of MLL-Af4 is interlinked with lymphoid lineage commitment. *Blood* **130**, 903–907.
- LIU, C., ADAMSON, E. & MERCOLA, D. (1996) Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11831–11836.
- LIU, H., WESTERGARD, T.D., CASHEN, A., PIWNICA-WORMS, D.R., KUNKLE, L., VIJ, R., PHAM, C.G., DiPERSIO, J., CHENG, E.H. & HSIEH, J.J. (2014) Proteasome inhibitors evoke latent tumor suppression programs in pro-B MLL leukemias through MLL-AF4. *Cancer Cell* **25**, 530–542.
- LIU, Y.-Y. (2011) Resuscitating wild-type p53 expression by disrupting ceramide glycosylation: a novel approach to target mutant p53 tumors. *Cancer Research* **71**, 6295–6299.
- LONG, E.O. & DAWID, I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* **49**, 727–764.
- LUO, Z., LIN, C., GUEST, E., GARRETT, A.S., MOHAGHEGH, N., SWANSON, S., MARSHALL, S., FLORENS, L., WASHBURN, M.P. & SHILATIFARD, A. (2012) The super elongation complex family of RNA polymerase II elongation factors: gene target specificity and transcriptional output. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 2608–2617.

- MA, C. & STAUDT, L.M. (1996) 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* **87**, 734–745.
- MAGEE, J.A. & SIGNER, R.A.J. (2021) Developmental Stage-Specific Changes in Protein Synthesis Differentially Sensitize Hematopoietic Stem Cells and Erythroid Progenitors to Impaired Ribosome Biogenesis. *Stem Cell Reports* **16**, 20–28.
- MAK, A.B., NIXON, A.M.L. & MOFFAT, J. (2012) The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription. *Cancer Research* **72**, 1929–1934.
- MANGAN, J.K. & SPECK, N.A. (2011) RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Critical Reviews in Oncogenesis* **16**, 77–91.
- MANN, G., ATTARBASCHI, A., SCHRAPPE, M., DE LORENZO, P., PETERS, C., HANN, I., DE ROSSI, G., FELICE, M., LAUSEN, B., LEBLANC, T., SZCZEPANSKI, T., FERSTER, A., JANKA-SCHAUB, G., RUBNITZ, J., SILVERMAN, L.B., ET AL. (2010) Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood* **116**, 2644–2650.
- MARKS, D.I., MOORMAN, A.V., CHILTON, L., PAIETTA, E., ENSHAIE, A., DEWALD, G., HARRISON, C.J., FIELDING, A.K., FORONI, L., GOLDSTONE, A.H., LITZOW, M.R., LUGER, S.M., MCMILLAN, A.K., RACEVSKIS, J., ROWE, J.M., ET AL. (2013) 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* **98**, 945–952.
- MARSCHALEK, R. (2011) Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *British journal of haematology* **152**, 141–154.
- MARSCHALEK, R., NILSON, I., LÖCHNER, K., GREIM, R., SIEGLER, G., GREIL, J., BECK, J.D. & FEY, G.H. (1997) The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leukemia & Lymphoma* **27**, 417–428.
- MARTINEZ-BALBÁS, M.A., BANNISTER, A.J., MARTIN, K., HAUS-SEUFFERT, P., MEISTERERENST, M. & KOUZARIDES, T. (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *The EMBO journal* **17**, 2886–2893.
- MAXIMOW, A.A. (1909) Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia. Haematol.* **8**, 125–134.

- MCMAHON, K.A., HIEW, S.Y.-L., HADJUR, S., VEIGA-FERNANDES, H., MENZEL, U., PRICE, A.J., KIOUSSIS, D., WILLIAMS, O. & BRADY, H.J.M. (2007) Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **1**, 338–345.
- MCSTAY, B. & GRUMMT, I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 131–157.
- MELČÁK, I., RISUEÑO, M.C. & RASKA, I. (1996) Ultrastructural nonisotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *Journal of Structural Biology* **116**, 253–263.
- MESTAS, J. & HUGHES, C.C.W. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**, 2731–2738.
- METZLER, M., FORSTER, A., PANNELL, R., ARENDS, M.J., DASER, A., LOBATO, M.N. & RABBITTS, T.H. (2006) A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using inverter technology. *Oncogene* **25**, 3093–3103.
- MEYER, C., BURMEISTER, T., GRÖGER, D., TSAUR, G., FECHINA, L., RENNEVILLE, A., SUTTON, R., VENN, N.C., EMERENCIANO, M., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., BARBIERI BLUNCK, C., ALMEIDA LOPES, B., ZUNA, J., TRKA, J., BALLERINI, P., ET AL. (2018) The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* **32**, 273–284.
- MILKEREIT, P. & TSCHOCHNER, H. (1998) A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *The EMBO journal* **17**, 3692–3703.
- MILLER, G., PANOV, K.I., FRIEDRICH, J.K., TRINKLE-MULCAHY, L., LAMOND, A.I. & ZOMERDIJK, J.C. (2001) hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *The EMBO journal* **20**, 1373–1382.
- MILLER, O.L. & BEATTY, B.R. (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science (New York, N.Y.)* **164**, 955–957.
- MONTANARO, L., TRERÉ, D. & DERENZINI, M. (2008) Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *The American Journal of Pathology* **173**, 301–310.
- MONTES, R., AYLLÓN, V., GUTIERREZ-ARANDA, I., PRAT, I., HERNÁNDEZ-LAMAS, M.C., PONCE, L., BRESOLIN, S., TE KRONNIE, G., GREAVES, M., BUENO, C. & MENENDEZ, P. (2011) 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* **117**, 4746–4758.
- MOOREFIELD, B., GREENE, E.A. & REEDER, R.H. (2000) RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4724–4729.
- MRÓZEK, K., HEINONEN, K., LAWRENCE, D., CARROLL, A.J., KODURU, P.R., RAO, K.W., STROUT, M.P., HUTCHISON, R.E., MOORE, J.O., MAYER, R.J., SCHIFFER, C.A. & BLOOMFIELD, C.D. (1997) Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood* **90**, 4532–4538.
- MUELLER, D., BACH, C., ZEISIG, D., GARCIA-CUELLAR, M.-P., MONROE, S., SREEKUMAR, A., ZHOU, R., NESVIZHSKII, A., CHINNAIYAN, A., HESS, J.L. & SLANY, R.K. (2007) A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* **110**, 4445–4454.
- MURANO, K., OKUWAKI, M., HISAOKA, M. & NAGATA, K. (2008) Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 3114–3126.
- MUSCARELLA, D.E., RACHLINSKI, M.K., SOTIRIADIS, J. & BLOOM, S.E. (1998) Contribution of Gene-Specific Lesions, DNA-Replication-Associated Damage, and Subsequent Transcriptional Inhibition in Topoisomerase Inhibitor-Mediated Apoptosis in Lymphoma Cells. *Experimental Cell Research* **238**, 155–167.
- NEGI, S.S. & BROWN, P. (2015a) rRNA synthesis inhibitor, CX-5461, activates ATM/ATR pathway in acute lymphoblastic leukemia, arrests cells in G2 phase and induces apoptosis. *Oncotarget* **6**, 18094–18104.
- NEGI, S.S. & BROWN, P. (2015b) rRNA synthesis inhibitor, CX-5461, activates ATM/ATR pathway in acute lymphoblastic leukemia, arrests cells in G2 phase and induces apoptosis. *Oncotarget* **6**, 18094–18104.
- NÉMETH, A., GUIBERT, S., TIWARI, V.K., OHLSSON, R. & LÄNGST, G. (2008) Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *The EMBO journal* **27**, 1255–1265.
- NIEMAS-TESHIBA, R., MATSUNO, R., WANG, L.L., TANG, X.X., CHIU, B., ZEKI, J., COBURN, J., ORNELL, K., NARANJO, A., VAN RYN, C., LONDON, W.B., HOGARTY, M.D., GASTIER-FOSTER, J.M., LOOK, A.T., PARK, J.R., ET AL. (2018) MYC-

family protein overexpression and prominent nucleolar formation represent prognostic indicators and potential therapeutic targets for aggressive high-MKI neuroblastomas: a report from the children's oncology group. *Oncotarget* **9**, 6416–6432.

- NIKOLAEV, S.I., SANTONI, F., VANNIER, A., FALCONNET, E., GIARIN, E., BASSO, G., HOISCHEN, A., VELTMAN, J.A., GROET, J., NIZETIC, D. & ANTONARAKIS, S.E. (2013) Exome sequencing identifies putative drivers of progression of transient myeloproliferative disorder to AMKL in infants with Down syndrome. *Blood* **122**, 554–561.
- NILSON, I., REICHEL, M., ENNAS, M.G., GREIM, R., KNÖRR, C., SIEGLER, G., GREIL, J., FEY, G.H. & MARSCHALEK, R. (1997) 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* **98**, 157–169.
- NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.A. (1960) A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science*, 1497.
- OCHS, R.L. & SMETANA, K. (1989) Fibrillar center distribution in nucleoli of PHA-stimulated human lymphocytes. *Experimental Cell Research* **184**, 552–557.
- OKAMOTO, S., MIYANO, K., KAJIKAWA, M., YAMAUCHI, A. & KURIBAYASHI, F. (2020) The rRNA synthesis inhibitor CX-5461 may induce autophagy that inhibits anticancer drug-induced cell damage to leukemia cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **84**, 2319–2326.
- OKUDA, H., KANAI, A., ITO, S., MATSUI, H. & YOKOYAMA, A. (2015) AF4 uses the SL1 components of RNAP1 machinery to initiate MLL fusion- and AEP-dependent transcription. *Nature communications* **6**, 8869.
- OKUDA, H., KAWAGUCHI, M., KANAI, A., MATSUI, H., KAWAMURA, T., INABA, T., KITABAYASHI, I. & YOKOYAMA, A. (2014) MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Research* **42**, 4241–4256.
- OLIVER, P.L., BITOUN, E., CLARK, J., JONES, E.L. & DAVIES, K.E. (2004) Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 14901–14906.
- ORKIN, S.H. & ZON, L.I. (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nature Immunology* **3**, 323–328.
- ORKIN, S.H. & ZON, L.I. (2008) Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**, 631–644.

- O'SULLIVAN, A.C., SULLIVAN, G.J. & McSTAY, B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 657–668.
- OTTERSBUCH, K., SANJUAN-PLA, A., TORRES-RUIZ, R., BUENO, C., VELASCO-HERNÁNDEZ, T. & MENENDEZ, P. (2018) The 'Never-Ending' Mouse Models for MLL-Rearranged Acute Leukemia Are Still Teaching Us. *HemaSphere* **2**, e57.
- PANOV, K.I., FRIEDRICH, J.K., RUSSELL, J. & ZOMERDIJK, J.C.B.M. (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *The EMBO journal* **25**, 3310–3322.
- PANOV, K.I., FRIEDRICH, J.K. & ZOMERDIJK, J.C. (2001) A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 2641–2649.
- PARK, S., OSMERS, U., RAMAN, G., SCHWANTES, R.H., DIAZ, M.O. & BUSHWELLER, J.H. (2010) The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry* **49**, 6576–6586.
- PARKS, M.M., KURYLO, C.M., DASS, R.A., BOJMAR, L., LYDEN, D., VINCENT, C.T. & BLANCHARD, S.C. (2018) Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Science Advances* **4**, eaao0665.
- PARLATO, R. & LISS, B. (2014) How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842**, 791–797.
- PATEL, A., DHARMARAJAN, V., VOUGHT, V.E. & COSGROVE, M.S. (2009) On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 24242–24256.
- PEI, Y. & SHUMAN, S. (2002) Interactions between Fission Yeast mRNA Capping Enzymes and Elongation Factor Spt5. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19639–19648.
- PESTOV, D.G., STREZOSKA, Z. & LAU, L.F. (2001) Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4246–4255.
- PEYROCHE, G., MILKEREIT, P., BISCHLER, N., TSCHOCHNER, H., SCHULTZ, P., SENTENAC, A., CARLES, C. & RIVA, M. (2000) The recruitment of RNA

- polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *The EMBO journal* **19**, 5473–5482.
- PIETERS, R., DE LORENZO, P., ANCLIFFE, P., AVERSA, L.A., BRETHON, B., BIONDI, A., CAMPBELL, M., ESCHERICH, G., FERSTER, A., GARDNER, R.A., KOTECHA, R.S., LAUSEN, B., LI, C.K., LOCATELLI, F., ATTARBASCHI, A., ET AL. (2019) Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Interfant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **37**, 2246–2256.
- PIKAARD, C.S., MCSTAY, B., SCHULTZ, M.C., BELL, S.P. & REEDER, R.H. (1989) The *Xenopus* ribosomal gene enhancers bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes & Development* **3**, 1779–1788.
- POORTINGA, G., HANNAN, K.M., SNELLING, H., WALKLEY, C.R., JENKINS, A., SHARKEY, K., WALL, M., BRANDENBURGER, Y., PALATSIDES, M., PEARSON, R.B., MCARTHUR, G.A. & HANNAN, R.D. (2004) MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *The EMBO Journal* **23**, 3325–3335.
- PRASAD, R., YANO, T., SORIO, C., NAKAMURA, T., RALLAPALLI, R., GU, Y., LESHKOWITZ, D., CROCE, C.M. & CANAANI, E. (1995) Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 12160–12164.
- PRIETO, C., MARSCHALEK, R., KÜHN, A., BURSEN, A., BUENO, C. & MENÉNDEZ, P. (2017) The AF4-MLL fusion transiently augments multilineage hematopoietic engraftment but is not sufficient to initiate leukemia in cord blood CD34+ cells. *Oncotarget* **8**, 81936–81941.
- PSCHYREMBEL, W., WITZEL, S. & DORNBLÜTH, O. (eds) (2007) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch* 261., neu bearb. und erw. Aufl. de Gruyter, Berlin.
- PUI, C.-H., CARROLL, W.L., MESHINCHI, S. & ARCECI, R.J. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 551–565.
- PUI, C.-H. & EVANS, W.E. (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine* **354**, 166–178.
- PUI, C.-H., GAYNON, P.S., BOYETT, J.M., CHESSELLS, J.M., BARUCHEL, A., KAMPS, W., SILVERMAN, L.B., BIONDI, A., HARMS, D.O., VILMER, E., SCHRAPPE, M. & CAMITTA, B. (2002) Outcome of treatment in childhood acute

- lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet (London, England)* **359**, 1909–1915.
- RAGIONE, F.D., CUCCIOLLA, V., CRINITI, V., INDACO, S., BORRIELLO, A. & ZAPPIA, V. (2003) p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 23360–23368.
- RAINIS, L., BERCOVICH, D., STREHL, S., TEIGLER-SCHLEGEL, A., STARK, B., TRKA, J., AMARIGLIO, N., BIONDI, A., MULER, I., REHAVI, G., KEMPSKI, H., HAAS, O.A. & IZRAELI, S. (2003) Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood* **102**, 981–986.
- RANDOLPH, T.R. (2005) Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. *Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology* **18**, 38–48.
- RASKA, I. (2003) Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends in Cell Biology* **13**, 517–525.
- RASKA, I., ARMBRUSTER, B.L., FREY, J.R. & SMETANA, K. (1983a) Analysis of ring-shaped nucleoli in serially sectioned human lymphocytes. *Cell and Tissue Research* **234**, 707–711.
- RASKA, I., RYCHTER, Z. & SMETANA, K. (1983b) Fibrillar centres and condensed nucleolar chromatin in resting and stimulated human lymphocytes. *Zeitschrift Fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung* **97**, 15–32.
- RAYES, A., MCMASTERS, R.L. & O'BRIEN, M.M. (2016) Lineage Switch in MLL-Rearranged Infant Leukemia Following CD19-Directed Therapy. *Pediatric Blood & Cancer* **63**, 1113–1115.
- RECHER, L., WHITESCARVER, J. & BRIGGS, L. (1969) The fine structure of a nucleolar constituent. *Journal of Ultrastructure Research* **29**, 1–14.
- REEDER, R.H. & ROEDER, R.G. (1972) Ribosomal RNA synthesis in isolated nuclei. *Journal of Molecular Biology* **67**, 433–441.
- REICHEL, M., GILLERT, E., BREITENLOHNER, I., REPP, R., GREIL, J., BECK, J.D., FEY, G.H. & MARSCHALEK, R. (1999) Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Research* **59**, 3357–3362.
- REICHEL, M., GILLERT, E., NILSON, I., SIEGLER, G., GREIL, J., FEY, G.H. & MARSCHALEK, R. (1998) Fine structure of translocation breakpoints in

- leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* **17**, 3035–3044.
- RICKARDS, B., FLINT, S.J., COLE, M.D. & LEROY, G. (2007) Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 937–948.
- ROBERT KOCH-INSTITUT & EPIDEMIOLOGISCHES KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016.
- ROEDER, R.G. & RUTTER, W.J. (1970) Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **65**, 675–682.
- ROSENBAUER, F. & TENEN, D.G. (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 105–117.
- ROUGVIE, A.E. & LIS, J.T. (1988) The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* **54**, 795–804.
- RUBBI, C.P. & MILNER, J. (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO journal* **22**, 6068–6077.
- SALIFOU, K., RAY, S., VERRIER, L., AGUIREBENGOA, M., TROUCHE, D., PANOV, K.I. & VANDROMME, M. (2016) The histone demethylase JMJD2A/KDM4A links ribosomal RNA transcription to nutrients and growth factors availability. *Nature Communications* **7**, 10174.
- SANIJ, E., POORTINGA, G., SHARKEY, K., HUNG, S., HOLLOWAY, T.P., QUIN, J., ROBB, E., WONG, L.H., THOMAS, W.G., STEFANOVSKY, V., MOSS, T., ROTHBLUM, L., HANNAN, K.M., MCARTHUR, G.A., PEARSON, R.B., ET AL. (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *The Journal of Cell Biology* **183**, 1259–1274.
- SANJUAN-PLA, A., BUENO, C., PRIETO, C., ACHA, P., STAM, R.W., MARSCHALEK, R. & MENÉNDEZ, P. (2015) Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **126**, 2676–2685.
- SANTANGELO, G.M., TORNOW, J., MCCLAUGHLIN, C.S. & MOLDAVE, K. (1988) Properties of promoters cloned randomly from the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 4217–4224.

- SANTORO, R. & GRUMMT, I. (2001) Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Molecular Cell* **8**, 719–725.
- SANTORO, R. & GRUMMT, I. (2005) Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 2539–2546.
- SANTORO, R., LI, J. & GRUMMT, I. (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature Genetics* **32**, 393–396.
- SATO, S., TOMOMORI-SATO, C., TSAI, K.-L., YU, X., SARDIU, M., SARAF, A., WASHBURN, M.P., FLORENS, L., ASTURIAS, F.J., CONAWAY, R.C. & CONAWAY, J.W. (2016) Role for the MED21-MED7 Hinge in Assembly of the Mediator-RNA Polymerase II Holoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 26886–26898.
- SAUVAGEAU, G., THORSTEINSDOTTIR, U., EAVES, C.J., LAWRENCE, H.J., LARGMAN, C., LANSDORP, P.M. & HUMPHRIES, R.K. (1995) Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & Development* **9**, 1753–1765.
- SCHEER, U. & HOCK, R. (1999) Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 385–390.
- SCHNAPP, G., SANTORI, F., CARLES, C., RIVA, M. & GRUMMT, I. (1994) The HMG box-containing nucleolar transcription factor UBF interacts with a specific subunit of RNA polymerase I. *The EMBO journal* **13**, 190–199.
- SCHNEIDER, R., BANNISTER, A.J., MYERS, F.A., THORNE, A.W., CRANE-ROBINSON, C. & KOUZARIDES, T. (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biology* **6**, 73–77.
- SCHOLZ, B., KOWARZ, E., ROSSLER, T., AHMAD, K., STEINHILBER, D. & MARSCHALEK, R. (2015) AF4 and AF4N protein complexes: recruitment of P-TEFb kinase, their interactome and potential functions. *American journal of blood research* **5**, 10–24.
- SEDKOV, Y., TILLIB, S., MIZROKHI, L. & MAZO, A. (1994) The bithorax complex is regulated by trithorax earlier during Drosophila embryogenesis than is the Antennapedia complex, correlating with a bithorax-like expression pattern of distinct early trithorax transcripts. *Development (Cambridge, England)* **120**, 1907–1917.

- SHAH, C.A., BEI, L., WANG, H., PLATANIAS, L.C. & EKLUND, E.A. (2012) HoxA10 Protein Regulates Transcription of Gene Encoding Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) in Myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 18230–18248.
- SHAH, C.A., WANG, H., BEI, L., PLATANIAS, L.C. & EKLUND, E.A. (2011) HoxA10 regulates transcription of the gene encoding transforming growth factor beta2 (TGFbeta2) in myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 3161–3176.
- SHAH, N. & SUKUMAR, S. (2010) The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews. Cancer* **10**, 361–371.
- SHAW, P.J. & JORDAN, E.G. (1995) The Nucleolus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**, 93–121.
- SHILATIFARD, A., LANE, W.S., JACKSON, K.W., CONAWAY, R.C. & CONAWAY, J.W. (1996) An RNA Polymerase II Elongation Factor Encoded by the Human ELL Gene. *Science* **271**, 1873–1876.
- SHWACHMAN, H., DIAMOND, L.K., OSKI, F.A. & KHAW, K.T. (1964) THE SYNDROME OF PANCREATIC INSUFFICIENCY AND BONE MARROW DYSFUNCTION. *The Journal of Pediatrics* **65**, 645–663.
- SIGNER, R.A.J., MAGEE, J.A., SALIC, A. & MORRISON, S.J. (2014) Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* **509**, 49–54.
- SLANY, R.K. (2005) When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematological Oncology* **23**, 1–9.
- SMETANA, K. (2009) Structural features of nucleoli in blood, leukemic, lymphoma and myeloma cells. *European Journal of Histochemistry* **46**, 125.
- SMETANA, K., FREIREICH, E.J. & BUSCH, H. (1968) Chromatin structures in ring-shaped nucleoli of human lymphocytes. *Experimental Cell Research* **52**, 112–128.
- SMETANA, K., KARBAN, J. & TRNENY, M. (2010) To the nucleolar bodies (nucleoli) in cells of the lymphocytic lineage in patients suffering from B – chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* **57**, 495–500.
- SMETANA, K., LEJNAR, J. & POTMĚSIL, M. (1967) A note to the demonstration of DNA in nuclei of blood cells in smear preparations. *Folia Haematologica (Leipzig, Germany: 1928)* **88**, 305–317.

- SOBELL, H.M. (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 5328–5331.
- SOBHIAN, B., LAGUETTE, N., YATIM, A., NAKAMURA, M., LEVY, Y., KIERNAN, R. & BENKIRANE, M. (2010) HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Molecular Cell* **38**, 439–451.
- SOMERVAILLE, T.C.P. & CLEARY, M.L. (2006) Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**, 257–268.
- STAM, R.W., SCHNEIDER, P., HAGELSTEIN, J.A.P., VAN DER LINDEN, M.H., STUMPPEL, D.J.P.M., DE MENEZES, R.X., DE LORENZO, P., VALSECCHI, M.G. & PIETERS, R. (2010) Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood* **115**, 2835–2844.
- STANEK, D., KOBERNA, K., PLISS, A., MALÍNSKÝ, J., MASATA, M., VECEROVA, J., RISUEÑO, M.C. & RASKA, I. (2001) Non-isotopic mapping of ribosomal RNA synthesis and processing in the nucleolus. *Chromosoma* **110**, 460–470.
- STATISTISCHES BUNDESAMT, WIESBADEN (2017) Amtliche Todesursachenstatistik.
- STAVROPOULOU, V., ALMOSAILLEAKH, M., ROYO, H., SPETZ, J.-F., JUGE, S., BRAULT, L., KOPP, P., IACOVINO, M., KYBA, M., TZANKOV, A., STADLER, M.B., CAZZANIGA, G., PETERS, A.H.F.M. & SCHWALLER, J. (2018) A Novel Inducible Mouse Model of MLL-ENL-driven Mixed-lineage Acute Leukemia. *HemaSphere* **2**, e51.
- STEFANOVSKY, V., LANGLOIS, F., GAGNON-KUGLER, T., ROTHBLUM, L.I. & MOSS, T. (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular Cell* **21**, 629–639.
- STRISSEL, P.L., STRICK, R., ROWLEY, J.D. & ZELEZNIK-LE, N.J. (1998) An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* **92**, 3793–3803.
- SUPER, H.J., MCCABE, N.R., THIRMAN, M.J., LARSON, R.A., LE BEAU, M.M., PEDERSEN-BJERGAARD, J., PHILIP, P., DIAZ, M.O. & ROWLEY, J.D. (1993) Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* **82**, 3705–3711.

- Swirski, Filip K., Matthias Nahrendorf, Martin Etzrodt, Moritz Wildgruber, Virna Cortez-Retamozo, Peter Panizzi, Jose-Luiz Figueiredo, et al. 2009. "Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites". *Science* 325 (5940): 612–16. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>.
- SYLVESTER, J.E., WHITEMAN, D.A., PODOLSKY, R., POZSGAY, J.M., RESPESS, J. & SCHMICKEL, R.D. (1986) The human ribosomal RNA genes: structure and organization of the complete repeating unit. *Human Genetics* **73**, 193–198.
- SZCZEPAŃSKI, T., HARRISON, C.J. & VAN DONGEN, J.J. (2010) Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *The Lancet Oncology* **11**, 880–889.
- TAKI, T., IDA, K., BESSHO, F., HANADA, R., KIKUCHI, A., YAMAMOTO, K., SAKO, M., TSUCHIDA, M., SETO, M., UEDA, R. & HAYASHI, Y. (1996) Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangements in infant acute leukemia. *Leukemia* **10**, 1303–1307.
- TEFFERI, A., DEWALD, G.W., LITZOW, M.L., CORTES, J., MAURO, M.J., TALPAZ, M. & KANTARJIAN, H.M. (2005) Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **80**, 390–402.
- THIEL, G. & CIBELLI, G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *Journal of Cellular Physiology* **193**, 287–292.
- THIRY, M., CHEUTIN, T., O'DONOHUE, M.F., KAPLAN, H. & PLOTON, D. (2000) Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA (New York, N.Y.)* **6**, 1750–1761.
- TILL, J.E. & McCULLOCH, E.A. (2012) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells ¹. *Radiation Research* **178**, AV3–AV7.
- TKACHUK, D.C., KOHLER, S. & CLEARY, M.L. (1992) Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**, 691–700.
- TORTORA, G.J., DERRICKSON, B.H. & PRIES, A.R. (2008) *Anatomie und Physiologie*. Wiley-VCH-Verl, Weinheim.
- TRENTIN, L., GIORDAN, M., DINGERMAN, T., BASSO, G., TE KRONNIE, G. & MARSCHALEK, R. (2009) Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *European journal of haematology* **83**, 406–419.

- TREERÉ, D., CECCARELLI, C., MONTANARO, L., TOSTI, E. & DERENZINI, M. (2004) Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* **52**, 1601–1607.
- TSAI, K.-L., YU, X., GOPALAN, S., CHAO, T.-C., ZHANG, Y., FLORENS, L., WASHBURN, M.P., MURAKAMI, K., CONAWAY, R.C., CONAWAY, J.W. & ASTURIAS, F.J. (2017) Mediator structure and rearrangements required for holoenzyme formation. *Nature* **544**, 196–201.
- TUAN, J.C., ZHAI, W. & COMAI, L. (1999) Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2872–2879.
- TURI, Z., LACEY, M., MISTRİK, M. & MOUDRY, P. (2019) Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging* **11**, 2512–2540.
- VAN DEN BERGHE, H., CASSIMAN, J.J., DAVID, G., FRYNS, J.P., MICHAUX, J.L. & SOKAL, G. (1974) Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* **251**, 437–438.
- VAN DEN BERGHE, H., DAVID, G., BROECKAERT-VAN ORSHOVEN, A., LOUWAGIE, A., VERWILGHEN, R., CASTEELS-VAN DAELE, M., EGGERMONT, E. & EECKELS, R. (1979) A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Human Genetics* **46**, 173–180.
- VIRGILI, A., BRAZMA, D., REID, A.G., HOWARD-REEVES, J., VALGAÑÓN, M., CHANALARIS, A., DE MELO, V.A., MARIN, D., APPERLEY, J.F., GRACE, C. & NACHEVA, E.P. (2008) FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. *Molecular Cytogenetics* **1**, 14.
- VOIT, R., SCHNAPP, A., KUHN, A., ROSENBAUER, H., HIRSCHMANN, P., STUNNENBERG, H.G. & GRUMMT, I. (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *The EMBO journal* **11**, 2211–2218.
- VOLAREVIC, S. (2000) Proliferation, But Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40S Ribosomal Protein S6. *Science* **288**, 2045–2047.
- VOS, S.M., FARNUNG, L., BOEHNING, M., WIGGE, C., LINDEN, A., URLAUB, H. & CRAMER, P. (2018a) Structure of activated transcription complex Pol II-DSIF-PAF-SPT6. *Nature* **560**, 607–612.

- VOS, S.M., FARNUNG, L., URLAUB, H. & CRAMER, P. (2018b) Structure of paused transcription complex Pol II-DSIF-NELF. *Nature* **560**, 601–606.
- WANG, K.C., HELMS, J.A. & CHANG, H.Y. (2009) Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends in Cell Biology* **19**, 268–275.
- WANG, M. & LEMOS, B. (2017) Ribosomal DNA copy number amplification and loss in human cancers is linked to tumor genetic context, nucleolus activity, and proliferation. *PLoS Genetics* **13**, e1006994.
- WANG, Z., SONG, J., MILNE, T.A., WANG, G.G., LI, H., ALLIS, C.D. & PATEL, D.J. (2010) Pro Isomerization in MLL1 PHD3-Bromo Cassette Connects H3K4me Readout to CyP33 and HDAC-Mediated Repression. *Cell* **141**, 1183–1194.
- WARING, P.M. & CLEARY, M.L. (1997) Disruption of a Homolog of Trithorax by 11q23 Translocations: Leukemogenic and Transcriptional Implications. In *Chromosomal Translocations and Oncogenic Transcription Factors* (eds F.J. RAUSCHER & P.K. VOGT), pp. 1–23. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- WARNER, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 437–440.
- WEINMANN, R. & ROEDER, R.G. (1974) Role of DNA-Dependent RNA Polymerase III in the Transcription of the tRNA and 5S RNA Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 1790–1794.
- WIDERA, M., WILHELM, A., TOPTAN, T., RAFFEL, J.M., KOWARZ, E., ROESMANN, F., SIEMUND, A.L., LUCIANO, V., KÜLP, M., REIS, J., BRACHARZ, S., PALLAS, C., CIESEK, S. & MARSCHALEK, R. (2021) Generation of a Sleeping Beauty transposon-based cellular system for rapid and sensitive identification of SARS-CoV-2 host dependency and restriction factors. preprint, Microbiology.
- WILKINSON, A.C., BALLABIO, E., GENG, H., NORTH, P., TAPIA, M., KERRY, J., BISWAS, D., ROEDER, R.G., ALLIS, C.D., MELNICK, A., DE BRUIJN, M.F.T.R. & MILNE, T.A. (2013) RUNX1 Is a Key Target in t(4;11) Leukemias that Contributes to Gene Activation through an AF4-MLL Complex Interaction. *Cell Reports* **3**, 116–127.
- WINDLE, J. & SOLLNER-WEBB, B. (1986) Upstream domains of the *Xenopus laevis* rDNA promoter are revealed in microinjected oocytes. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 1228–1234.

- WONG, K.H., JIN, Y. & STRUHL, K. (2014) TFIIH phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Molecular Cell* **54**, 601–612.
- WU, C.-H., YAMAGUCHI, Y., BENJAMIN, L.R., HORVAT-GORDON, M., WASHINSKY, J., ENERLY, E., LARSSON, J., LAMBERTSSON, A., HANDA, H. & GILMOUR, D. (2003) NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes & Development* **17**, 1402–1414.
- XIA, Z.-B., ANDERSON, M., DIAZ, M.O. & ZELEZNIK-LE, N.J. (2003) MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8342–8347.
- XIE, W.Q. & ROTHBLUM, L.I. (1992) Domains of the rat rDNA promoter must be aligned stereospecifically. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 1266–1275.
- YAGI, H., DEGUCHI, K., AONO, A., TANI, Y., KISHIMOTO, T. & KOMORI, T. (1998) Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**, 108–117.
- YAMADA, T., YAMAGUCHI, Y., INUKAI, N., OKAMOTO, S., MURA, T. & HANDA, H. (2006) P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Molecular Cell* **21**, 227–237.
- YAMAGUCHI, Y., TAKAGI, T., WADA, T., YANO, K., FURUYA, A., SUGIMOTO, S., HASEGAWA, J. & HANDA, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41–51.
- YANG, H., HUANG, S., ZHU, C.-Y., GAO, L., ZHU, H.-Y., LV, N., JING, Y. & YU, L. (2016) The Superiority of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Over Chemotherapy Alone in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia Patients with Mixed Lineage Leukemia (MLL) Rearrangements. *Medical Science Monitor* **22**, 2315–2323.
- YANO, T., NAKAMURA, T., BLECHMAN, J., SORIO, C., DANG, C.V., GEIGER, B. & CANAANI, E. (1997) Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 7286–7291.
- YOKOYAMA, A. & CLEARY, M.L. (2008) Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* **14**, 36–46.

- YOKOYAMA, A., FICARA, F., MURPHY, M.J., MEISEL, C., HATANAKA, C., KITABAYASHI, I. & CLEARY, M.L. (2013) MLL Becomes Functional through Intra-Molecular Interaction Not by Proteolytic Processing. *PLoS ONE* **8**, e73649.
- YOKOYAMA, A., FICARA, F., MURPHY, M.J., MEISEL, C., NARESH, A., KITABAYASHI, I. & CLEARY, M.L. (2011) Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *Journal of Cell Science* **124**, 2208–2219.
- YOKOYAMA, A., KITABAYASHI, I., AYTON, P.M., CLEARY, M.L. & OHKI, M. (2002) Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100**, 3710–3718.
- YOKOYAMA, A., LIN, M., NARESH, A., KITABAYASHI, I. & CLEARY, M.L. (2010) A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* **17**, 198–212.
- YOKOYAMA, A., SOMERVAILE, T.C.P., SMITH, K.S., ROZENBLATT-ROSEN, O., MEYERSON, M. & CLEARY, M.L. (2005) The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**, 207–218.
- YOKOYAMA, A., WANG, Z., WYSOCKA, J., SANYAL, M., AUFIERO, D.J., KITABAYASHI, I., HERR, W. & CLEARY, M.L. (2004) Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 5639–5649.
- YOSHIDA, K., TOKI, T., OKUNO, Y., KANEZAKI, R., SHIRAISHI, Y., SATO-OTSUBO, A., SANADA, M., PARK, M., TERUI, K., SUZUKI, H., KON, A., NAGATA, Y., SATO, Y., WANG, R., SHIBA, N., ET AL. (2013) The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genetics* **45**, 1293–1299.
- YU, B.D., HANSON, R.D., HESS, J.L., HORNING, S.E. & KORSMEYER, S.J. (1998) MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10632–10636.
- YU, B.D., HESS, J.L., HORNING, S.E., BROWN, G.A. & KORSMEYER, S.J. (1995) Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**, 505–508.

- YUAN, X., FENG, W., IMHOF, A., GRUMMT, I. & ZHOU, Y. (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Molecular Cell* **27**, 585–595.
- ZEISIG, D.T., BITTNER, C.B., ZEISIG, B.B., GARCÍA-CUÉLLAR, M.-P., HESS, J.L. & SLANY, R.K. (2005) The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* **24**, 5525–5532.
- ZHAI, W. & COMAI, L. (2000) Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5930–5938.
- ZHANG, L., MCGRAW, K.L., SALLMAN, D.A. & LIST, A.F. (2017) The role of p53 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: molecular aspects and clinical implications. *Leukemia & Lymphoma* **58**, 1777–1790.
- ZHANG, L.-S., KANG, X., LU, J., ZHANG, Y., WU, X., WU, G., ZHENG, J., TULADHAR, R., SHI, H., WANG, Q., MORLOCK, L., YAO, H., HUANG, L.J.-S., MAIRE, P., KIM, J., ET AL. (2019) Installation of a cancer promoting WNT/SIX1 signaling axis by the oncofusion protein MLL-AF9. *EBioMedicine* **39**, 145–158.
- ZOMERDIJK, J.C., BECKMANN, H., COMAI, L. & TJIAN, R. (1994) Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 2015–2018.
- ZYLBER, E.A. & PENMAN, S. (1971) Products of RNA polymerases in HeLa cell nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 2861–2865.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Hämatopoese.	2
Abb. 1.2 Arten & Anteile von Krebsneuerkrankungen in Deutschland.	4
Abb. 1.3 Verteilung Akut lymphatischer Leukämien nach Alter und Geschlecht.	6
Abb. 1.4 Translokationspartnergene in MLL Rearrangements und die Verteilung nach Altersgruppen.	10
Abb. 1.5 Schematische Darstellung des MLL Proteins.	11
Abb. 1.6 Schematische Darstellung des AF4 Proteins. (A)	16
Abb. 1.7 Die t(4;11) Translokation.	19
Abb. 1.8 Schematische Darstellung der Fusionsproteine MLL-AF4 & AF4-MLL.	20
Abb. 1.9 Subkompartimentierung des Nukleolus.	24
Abb. 1.10 Aufbau rRNA Geneinheiten.	25
Abb. 1.11 Präinitiationskomplex der Pol I.	26
Abb. 2.1 Schema der Transpositionskassette der <i>Sleeping Beauty</i> Vektoren.	44
Abb. 2.2 Schema der MACE 3'RNA Sequenzierungstechnik.	52
Abb. 2.3 Prinzip der Saccharosedichtegradientenzentrifugation.	58
Abb. 3.1 Klonierungsschema für die Konstruktion des chimären D11m in pSBtet_B.	62
Abb. 3.2 Sequenzalignment von D11 & D11m.	64
Abb. 3.3 Schematische Darstellung der verwendeten Transpositionskassetten.	66
Abb. 3.4 Nachweis der Expression der t(4;11) Fusionsgene in induzierbaren HEK 293T Zelllinien.	67
Abb. 3.5 Viabilitätsuntersuchung der t(4;11) transgenexprimierenden HEK 293T Zelllinien.	69
Abb. 3.6 Überprüfung des Einflusses von D11 & D11m auf die <i>HOXA9</i> Expression.	70
Abb. 3.7 VENN Diagramm der Genexpressionsstudien.	71
Abb. 3.8 <i>Heatmap</i> der Genexpressionsstudien.	73

Abb. 3.9 <i>Volcano Plot</i> der Genexpressionsstudien.	74
Abb. 3.10 Überprüfung der Interaktion zwischen TAF _I C (SL1) & der humanen, bzw. murinen pSer Domäne.	76
Abb. 3.11 Lokalisation von D11::mCh & D11m::mCh.	78
Abb. 3.12 Chromatin-Immunopräzipitation zur Untersuchung der Bindung von D11::mCh, bzw. D11m::mCh am rRNA Promotor.	79
Abb. 3.13 Lokalisation der Pol II.	81
Abb. 3.14 Chromatin-Immunopräzipitation zur Untersuchung des Einflusses von D11::mCh & D11m::mCh auf die Bindung der Pol II am rRNA Promotor.	82
Abb. 3.15 Einfluss von D11 & D11m auf die Nukleolimorphologie.	83
Abb. 3.16 Generierung Luciferase-Reportervektorsystems zur Untersuchung der rRNA Promotoraktivität.	86
Abb. 3.17 Überprüfung der RNA Polymerase I abhängigen Transkription des Luciferasegens des Vektors pGL3-IRES-hprRNA.	87
Abb. 3.18 Messung der rRNA Promotoraktivität in t(4;11) exprimierenden Zellen.	89
Abb. 3.19 Quantifizierung des Prä-rRNA Transkriptes & der aktiven rDNA.	91
Abb. 3.20 Überprüfung des Einflusses von t(4;11) Fusionsproteinen auf die 18S & 28S rRNA.	92
Abb. 3.21 Einfluss der t(4;11) Transproteine auf das Polysomenprofil.	95
Abb. 3.22 Quantifizierung der ribosomalen Einheiten unter Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine.	95
Abb. 3.23 Einfluss der t(4;11) Fusionsproteine auf die Proteinsynthese.	97
Abb. 3.24 Studien zum Zellwachstum & dem Energiemetabolismus.	98
Abb. 3.25 Beeinflussung des p53 Proteinlevels.	100
Abb. 3.26 Beeinflussung des β -Catenin Proteinlevels.	101
Abb. 3.27 Überprüfung des Einflusses der t(4;11) Fusionsproteine auf die <i>HOXB4</i> Expression.	103
Abb. 3.28 Analyse verschiedener Histonmodifikationen.	104
Abb. 4.1 Schema der Ribosomenbiogenese.	107

Abb. 4.2 Modell der D11 induzierten Co-Lokalisierung der Pol II am rRNA Promotor.

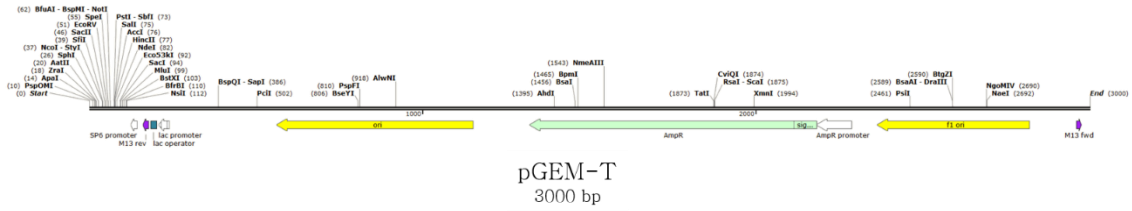
116

7 Tabellenverzeichnis

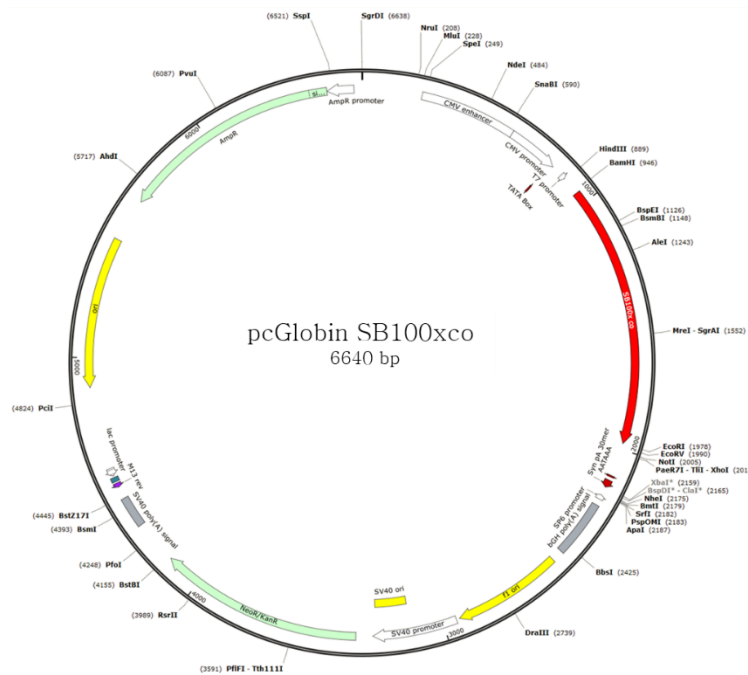
Tab. 2.1 Generierte stabile Zelllinien mittels <i>Sleeping Beauty</i> Transpositionssystem.	30
Tab. 2.2 Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.	31
Tab. 2.3 Verwendete pSBtet-Vektoren	32
Tab. 2.4 Luciferase-Reporter Vektoren	33
Tab. 2.5 Starteroligonukleotide	33
Tab. 2.6 Medien, Lösungen & deren Hersteller, bzw. Herstellung	34
Tab. 2.7 Antikörper & deren Hersteller	38
Tab. 2.8 Enzyme, Kits & deren Hersteller	38
Tab. 2.9 Geräte & deren Hersteller	39
Tab. 2.10 Chemikalien & deren Hersteller	40
Tab. 2.11 Verbrauchs-, sowie sonstige Materialien & deren Hersteller	41
Tab. 2.12 Transfektionsparameter	45
Tab. 2.13 Transfektionsansätze für das Luciferase-Reporter-system	47
Tab. 2.14 Sequenzierprogramm	50
Tab. 2.15 qPCR Programm	51
Tab. 2.16 Fluorophore und ihre Anregungs- & Emissionswellenlängen	60
Tab. 4.1 Auswahl an chemotherapeutischen Substanzen welche die RiBi, bzw. die Proteintranslation inhibieren. (Catez <i>et al.</i> , 2019)	119

8 Vektorkarten

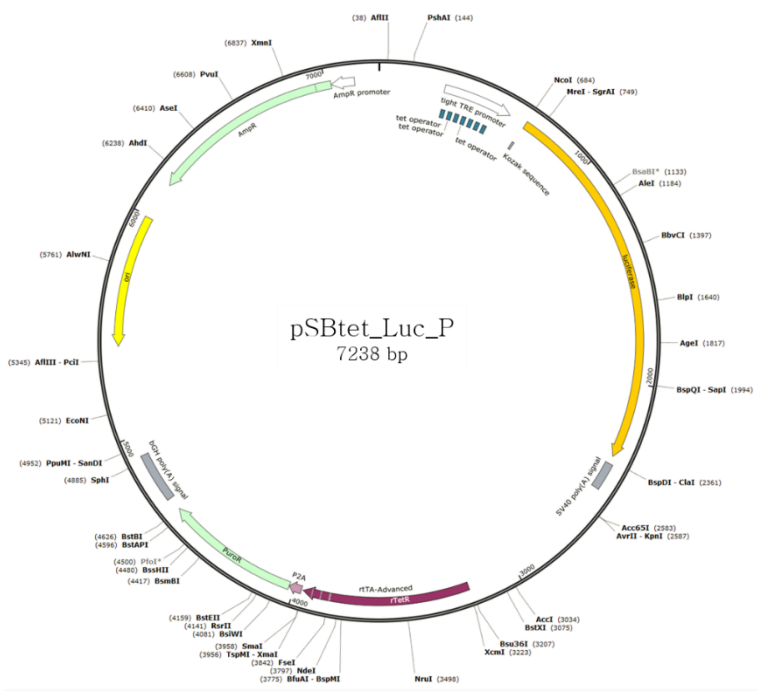
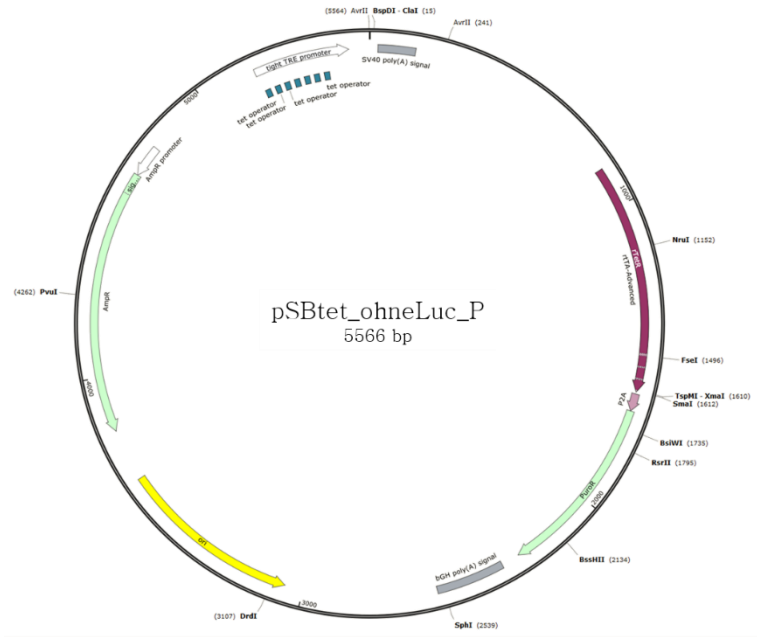
8.1 Klonierungsvektor

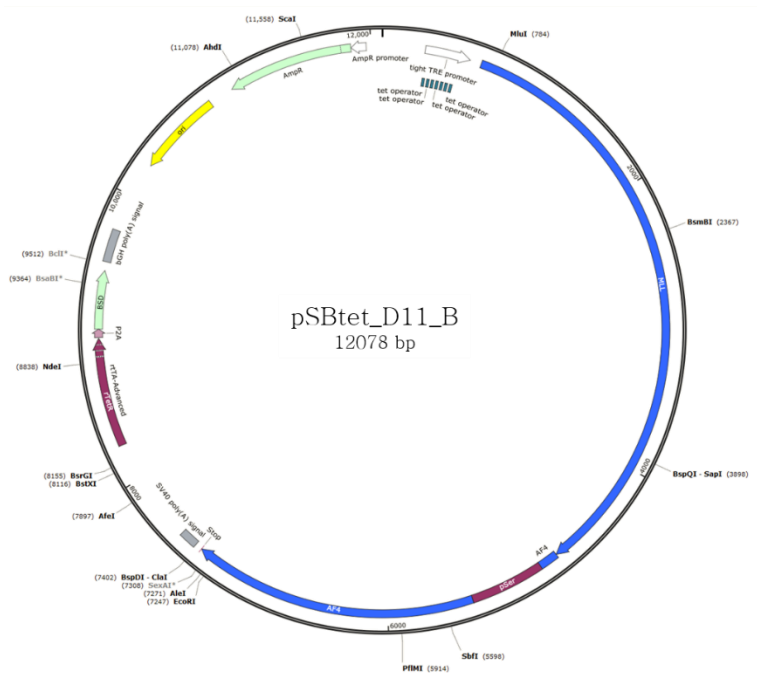
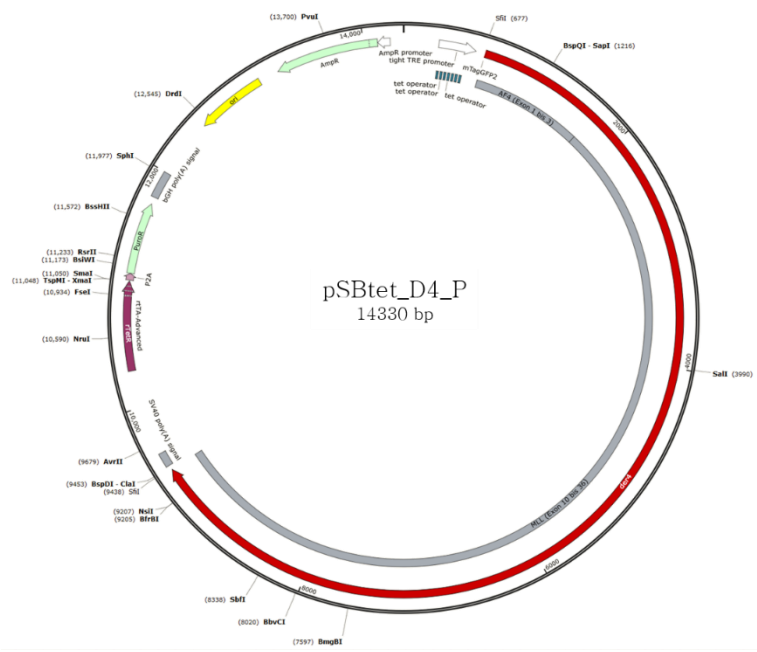


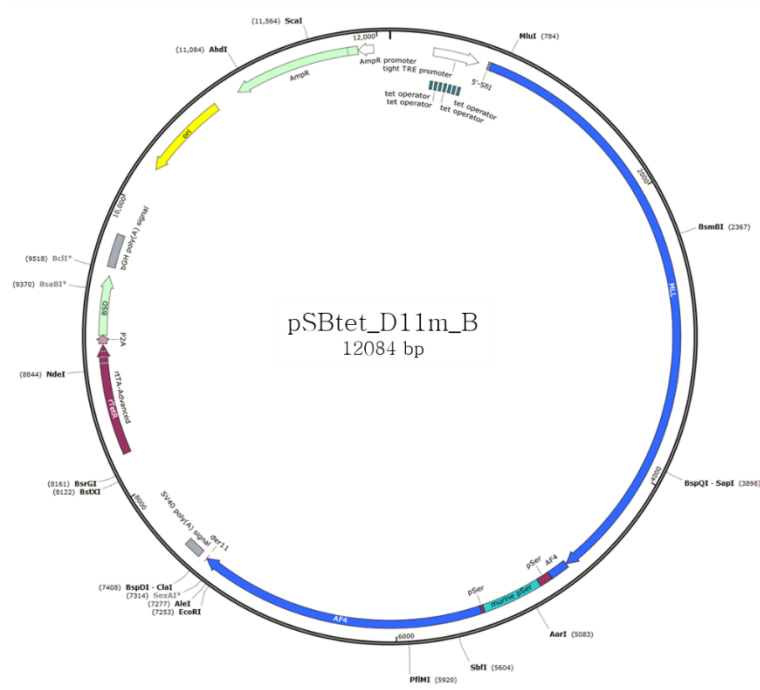
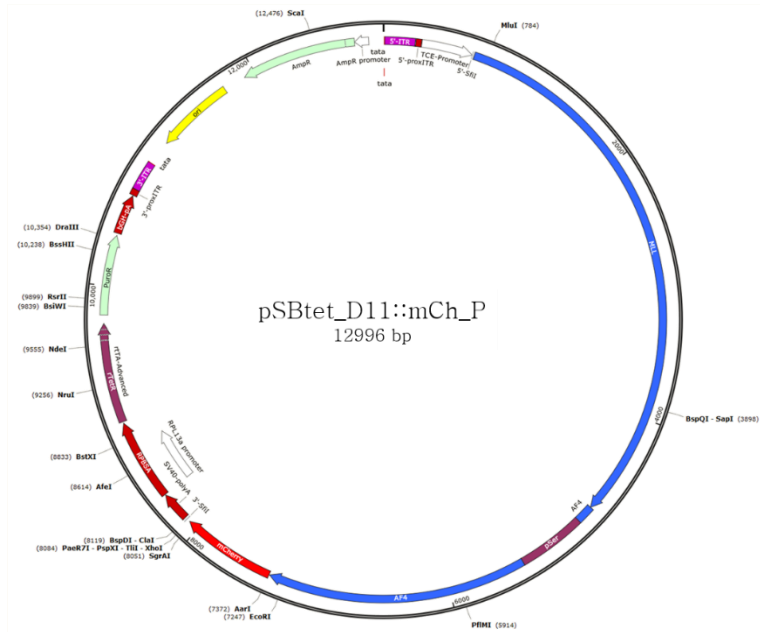
8.2 Transposasevektor

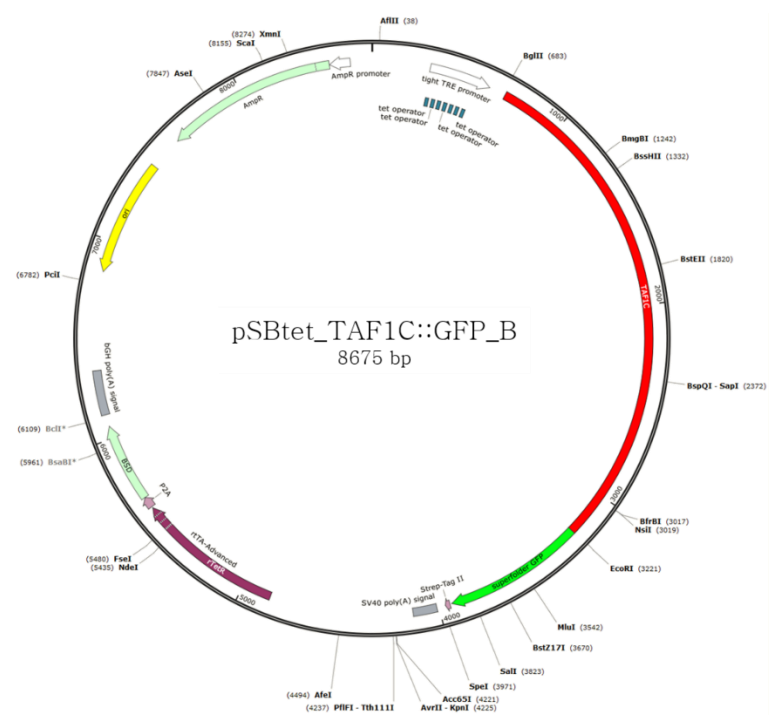
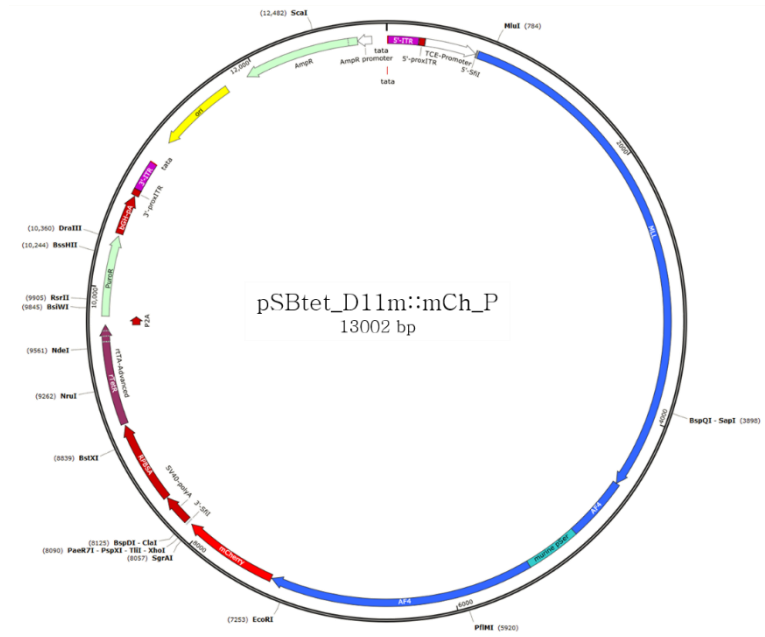


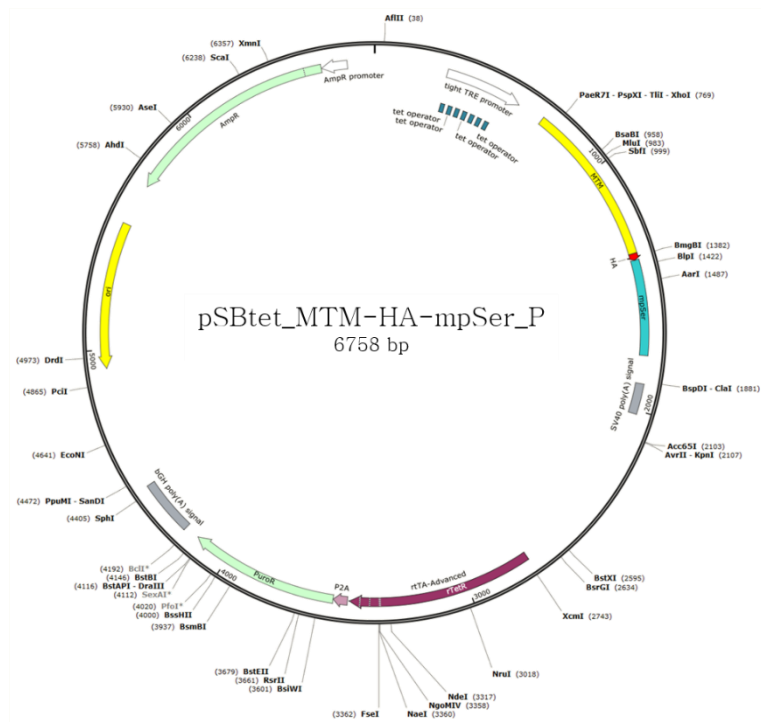
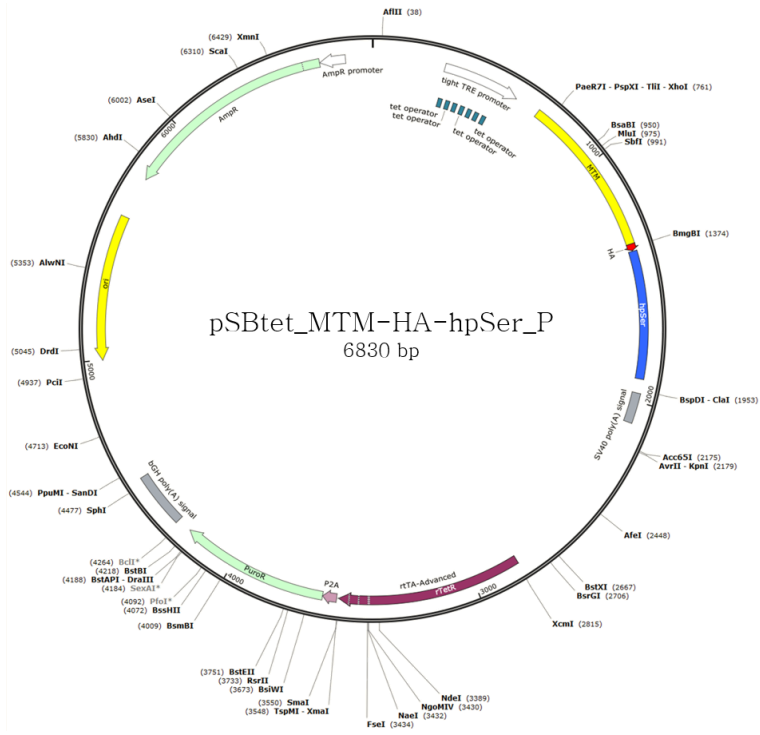
8.3 Sleeping Beauty Vektoren

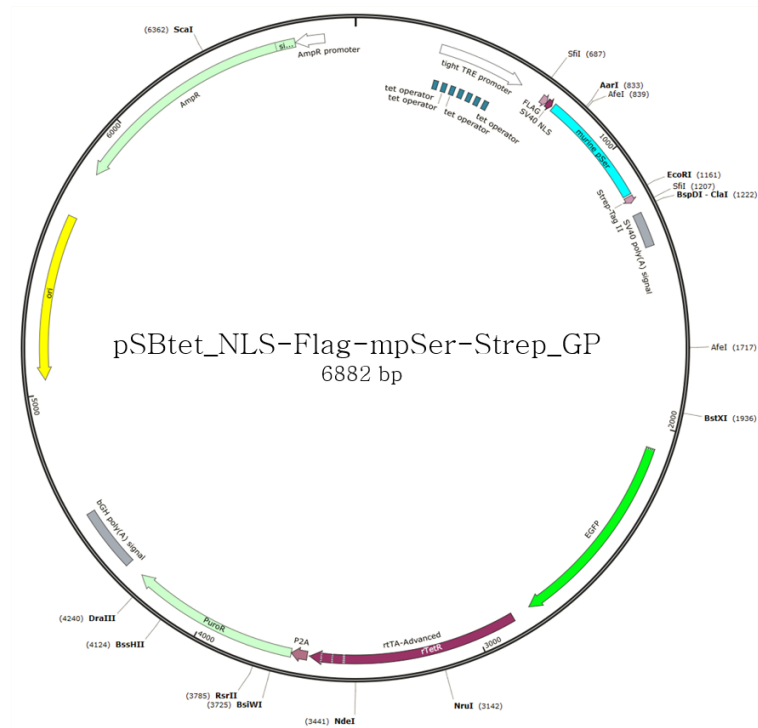




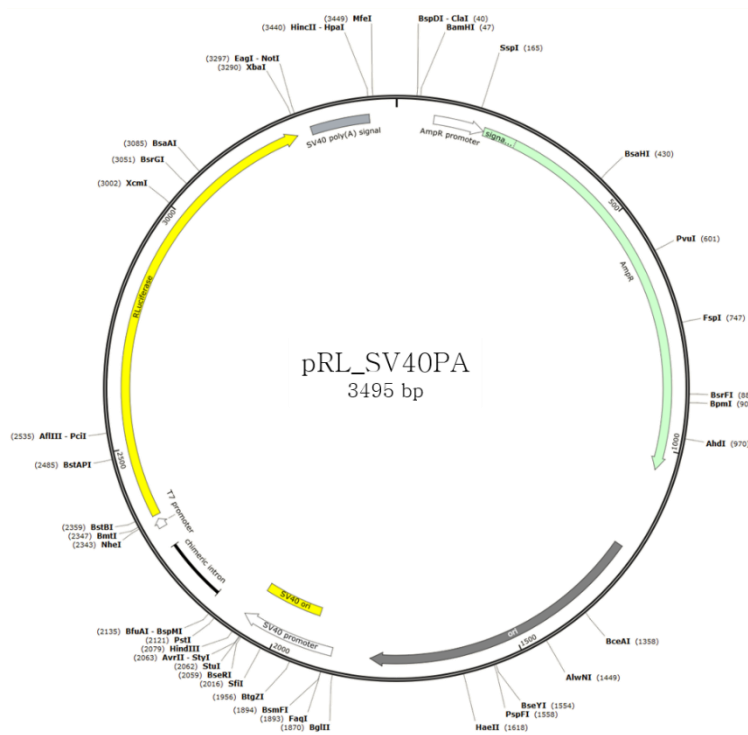


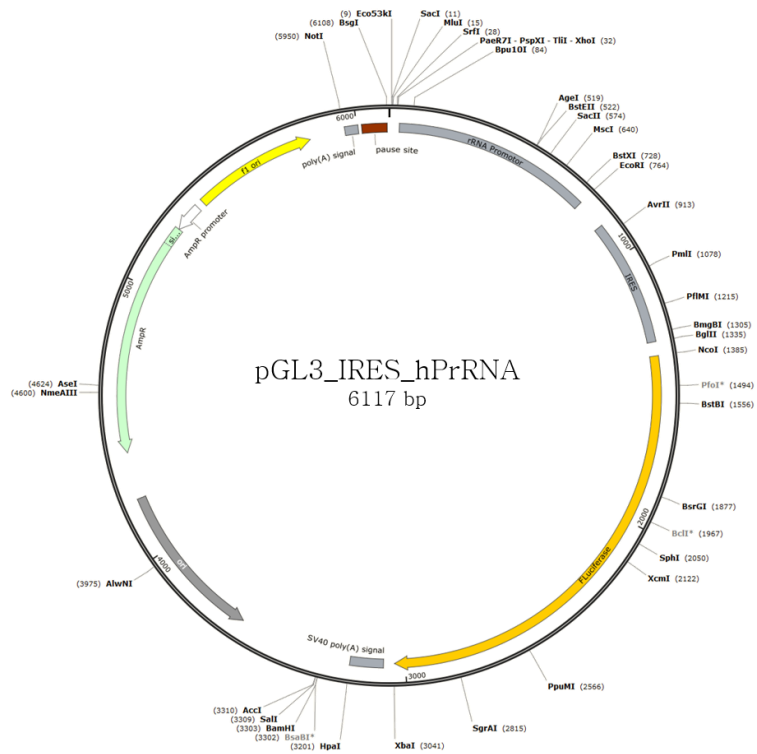






8.4 Luciferase-Reportervektoren





9 Beitrag zur SARS-CoV2 Forschung

Im Zeitraum von April 2020 bis April 2021 wurde im Rahmen einer Foshungskoooperation mit der Medizinischen Virologie der Goethe Universität ein Beitrag zur Erforschung und Bekämpfung der SARS-CoV2-Pandemie geleistet.

Ziel war es eine Reporterzelllinie zu etablieren, welche für Untersuchungen von SARS-CoV-2 Infektionen genutzt werden kann. Dazu wurden die beiden Gene *ACE2* (*carboxypeptidase angiotensin I converting enzyme 2*) und *TMPRSS2* (*transmembrane protease serine 2*) in die humane Lungenepithelzelllinie A549 mittels des in unserem Arbeitskreis optimierten *Sleeping Beauty* Transpositionssystems integriert (Widera *et al.*, 2021). Beide Gene werden für den Zelleintritt von SARS-CoV-2 benötigt. Neben diesen beiden Konstrukten wurden 93 weitere *Sleeping Beauty* Vektoren generiert. Der Effekt der Expression dieser verschiedenen Transgene auf die Infektionseffizienz von SARS-CoV-2 soll in weiteren Studien an der Reporterzelllinie untersucht werden.

10 Danksagung

Als erstes gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Rolf Marschalek für die Vergabe dieser spannenden Doktorarbeit, sowie die immer offene Tür für Fragen und Diskussionen jeder Art.

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

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Vanessa Luciano, Dr. Claus Meyer, Marius Külp und Patrick Streb. Ihr seid über die Laborzeit hinaus für mich gute Freunde geworden und Vanessa eine echte Laborschwester. Ich werde unsere anregenden Gespräche in den Kaffeepausen sehr vermissen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Alessa Kühn für ein tolles erstes Promotionsjahr und die supergute Einarbeitung!

Des Weiteren möchte ich mich bei Jenny Merkens für die viele Hilfe bei vielen Klonierungen, bei Dr. Eric Kowarz für die Hilfe bei Planungen und Auswertungen, bei Silvia Bracharz für die Unterstützung in der Zellkultur und bei Dr. Patrizia Larghero für die bioinformatische Hilfestellung bedanken.

Dr. Ilse Zündorf danke ich für spannende Zeiten im BioI Praktikum und noch schönere Momente beim Sekt hinterher!

Auch allen anderen Laborkollegen und Mitarbeitern: Lisa Tschage, Dr. Arpita Kundu, Freia Pfeil, Valerie Streek, Alexander Wilhelm und der ganzen Gruppe AK Fürst danke ich für die schöne Zeit und fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinem Freund Sascha für die fortlaufende Unterstützung seit Beginn des Studiums. Ihr seid stets mein Rückhalt gewesen, über alle Höhen und Tiefen hinweg.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anna Lena Siemund, die hier vorgelegte Dissertation über
„Untersuchungen zu pathomolekularen Funktionen
von t(4;11) Fusionsproteinen“

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

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

Frankfurt am Main, den

..... Unterschrift

12 Anhang

12.1 Akademischer Lebenslauf

Anna Lena Siemund

Wohnort: Wolfspfad 2, 61206 Wöllstadt

Geboren am 17.09.1991 in Frankfurt am Main



-
- | | |
|-----------|---|
| 2017–2021 | Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie
an der Goethe Universität Frankfurt/Main

Abschluss: PhD

Thema: „Untersuchungen zu pathomolekularen
Funktionen von t(4;11) Fusionsproteinen“ |
| 2014–2017 | Studium der Molekularen Biowissenschaften an der
Goethe Universität in Frankfurt/Main

Abschluss: Master of Science

Thema Abschlussarbeit: „Analysen zur Regulation
der Phospholipasen D in <i>Acinetobacter baumannii</i> “ |
| 2011–2014 | Studium der Biowissenschaften an der Goethe
Universität in Frankfurt/Main

Abschluss: Bachelor of Science

Thema Abschlussarbeit: „Ethanolstoffwechsel in
<i>Acetobacterium woodii</i> : Molekulare und
Biochemische Analysen zur Identifizierung der
Ethanol- Dehydrogenase“ |
| 2002–2011 | Kurt-Schumacher-Schule in Karben

Abschluss: Abitur |

12.2 Publikationen, Präsentationen & Poster

- 2021 Siemund, A.L., E. Kowarz, R. Marschalek, 2021. Functional studies of MLL-AF4 and a murinized pSer variant thereof: MLL-AF4 impairs the ribosome biosynthesis pathway. (submitted)
- Widera M, *et al.*, 2021. Generation of a Sleeping Beauty transposon-based cellular system for rapid and sensitive identification of SARS-CoV-2 host dependency and restriction factors. *Front. Microbiol.* doi.org/10.3389/fmicb.2021.701198
- 2020 Publikation aus Teilen der Masterarbeit im Journal Environmental Microbiology
- Pfefferle K, *et al.*, 2020. In vivo synthesis of monolysocardiolipin and cardiolipin by *Acinetobacter baumannii* phospholipase D and effect on cationic antimicrobial peptide resistance. *Environ. Microbiol.* 2020 Dec;22(12):5300-5308
- 2020 Abstract zum Vortrag auf der 33. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatr. onkolog. Forschung
- 2016 Poster aus Teilen der Masterarbeit auf der Jahrestagungen der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
- 2015 Publikation aus Teilen der Bachelorarbeit im Journal Environmental Microbiology
- Bertsch, J, A. Siemund, F. Kremp and V. Müller, 2015. A novel route for ethanol oxidation in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: the acetaldehyde/ethanol pathway. *Environ. Microbiol.* 2016 Sep;18(9):2913-22