

Untersuchung des Beitrags von *ETV6/RUNX1* zur Entstehung akuter lymphatischer Leukämie (ALL) im Kindesalter

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kerstin Hasse

Berlin, Dezember 2012

1. Gutachter: Prof. Hartmut Oschkinat

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

2. Gutachter: Prof. Burghardt Wittig

Institut für Molekularbiologie und Bioinformatik der FU Berlin

Tag der Disputation: 19. November 2012

Inhaltsverzeichnis

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Leukämien	1
1.2. ALL im Kindesalter.....	2
1.2.1. Immunphänotypen der ALL.....	3
1.2.2. Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei ALL	4
1.3. Molekulare Pathogenese von Leukämien	7
1.4. Die Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1	8
1.4.1. Transkriptionsfaktor ETV6.....	8
1.4.1.1. Genstruktur von <i>ETV6</i>	8
1.4.1.2. ETV6-Protein und Funktion.....	9
1.4.1.3. Veränderung von ETV6 bei Leukämien	12
1.4.2. Transkriptionsfaktor RUNX1	14
1.4.2.1. Genstruktur von <i>RUNX1</i>	14
1.4.2.2. RUNX1-Protein und Funktion.....	15
1.4.2.3. Veränderung von RUNX1 bei Leukämien	19
1.5. Der chimäre Transkriptionsfaktor ETV6/RUNX1	21
1.5.1. Fusionsgen <i>ETV6/RUNX1</i>	21
1.5.2. ETV6/RUNX1-Fusionsprotein	22
1.5.3. Funktion und Einfluss von ETV6/RUNX1 auf Leukämien.....	23
1.6. t(12;21) bei ALL im Kindesalter.....	25
1.7. Fragestellung und Zielsetzung.....	26
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Material.....	28
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.2. Bakterienstämme und Zelllinien	28
2.1.3. Medien und Agarplatten für <i>E. coli</i>	29
2.1.4. Plasmidvektoren	30
2.1.5. Antikörper und Antiseren.....	31
2.2. Molekularbiologische Techniken.....	31
2.2.1. Anzucht von <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	31
2.2.2. Methoden zur Isolierung von DNA	32
2.2.2.1. Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit.....	32
2.2.2.2. Plasmidisolierung mit dem JetStar Kit von Genomed	32
2.2.2.3. Isolierung genomischer DNA mit dem Generation Capture Column Kit von Qiagen	32
2.2.3. Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.2.4. Aufreinigung von PCR-Fragmenten	33

2.2.5.	Real time quantitative PCR	33
2.2.6.	Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.7.	Klonierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.7.1.	In-Fusion-PCR-Klonierung	35
2.2.7.2.	Creator-Rekombination	37
2.2.8.	Das Creator-kompatible onkoretrovirale Vektorsystem RevTet-ON	39
2.2.9.	Transformation	40
2.2.10.	Spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..	40
2.2.11.	DNA-Sequenzierung	40
2.2.11.1.	Sequenzierreaktion	40
2.2.11.2.	Aufreinigung der Sequenzierreaktion	41
2.2.11.3.	Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	41
2.2.12.	Präparation von RNA	41
2.2.12.1.	Präparation von Gesamt-RNA	41
2.2.12.2.	Präparation Gesamt- und micro RNA.....	41
2.2.13.	cDNA-Erststrangsynthese durch Reverse Transkription	42
2.2.14.	Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen	42
2.2.14.1.	Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
2.2.14.2.	Quantifizierung von Proteinen	43
2.2.15.	Isolierung von Proteinen	43
2.2.16.	Nachweis von Proteinen im Western Blot	45
2.2.16.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.2.16.2.	Proteintransfer auf PVDF-Membran.....	46
2.2.16.3.	Immunfärbung	46
2.3.	Zellkultur / Heterologe Expression	47
2.3.1.	Kultivierung der Zellen	47
2.3.2.	Transiente Transfektion	48
2.3.3.	Selektion stabiler Zellen	49
2.3.4.	Reinigung vitaler Zellen mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	50
2.3.5.	Beschichtung von Zellkulturplatten mit Retronectin	50
2.3.6.	Infektion von Zielzellen.....	50
2.3.6.1.	Produktion und Aufreinigung der Viren	51
2.3.6.2.	Infektion adhärenter Zellen	51
2.3.6.3.	Infektion von Suspensionszellen in Retronectin-beschichteten Zellkulturplatten.....	51
2.3.6.4.	Ko-Kultur von PT67 und BaF3	52
2.3.6.5.	Infektion im 96-Well-Format	52
2.3.7.	Isolierung von Klonen durch limitierte Verdünnung der Zellen	52
2.4.	Zellbiologische Methoden	53
2.4.1.	Proliferations- und Zytotoxizitätsmessung mit dem MTS-Assay .	53
2.4.2.	Apoptose- und Nekrosedetektion mittels Annexin V-Markierung und Propidiumiodidfärbung	54
2.4.3.	Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Propidiumiodidfärbung .	54
2.4.4.	Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenproteinen	54
2.4.5.	Quantifizierung sekretierter Proteine mittels Sandwich-ELISA....	55

2.5.	Genexpressionsanalyse mit Oligonukleotidarrays	55
2.5.1.	cDNA-Synthese, Hybridisierung und Fluoreszenzdetektion.....	55
2.5.2.	Statistische Auswertung.....	56
2.5.3.	Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.....	57
2.6.	Proteomanalyse.....	58
2.6.1.	2D-Gelelektrophorese.....	58
2.6.1.1.	Isoelektrische Fokussierung.....	58
2.6.1.2.	SDS-PAGE	59
2.6.1.3.	Silberfärbung.....	59
2.6.2.	Quantifizierung der Proteinspots mit Delta2D	60
2.6.3.	Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF.....	60
2.6.4.	Statistische Auswertung.....	61
3.	Ergebnisse	62
3.1.	Herstellung eines stabilen zellulären Systems mit induzierbarer TEL/AML1- Expression	62
3.1.1.	Auswahl und Charakterisierung der Zielzelllinie.....	62
3.1.2.	Gentransfer in hämatopoetische Zellen	62
3.1.2.1.	Umklonierung der <i>ETV6</i> -, <i>RUNX1</i> - und <i>ETV6/RUNX1</i> -Sequenzen aus dem Vektor pCMV5 in den experimentellen Vektor des RevTet-ON-Systems.....	63
3.1.3.	Virenproduktion und Infektion der Zielzellen	64
3.1.3.1.	Konzentrieren der Viren und Infektion im 96-Well-Format	66
3.1.4.	Isolierung von BaF3-Klonen.....	66
3.1.4.1.	Sequenzverlust der ins Genom integrierten Proviren.....	68
3.1.5.	Verifizierung der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression in den Klonen	72
3.1.5.1.	Basalexpression und Induzierbarkeit der <i>ETV6/RUNX1</i> - Expression	72
3.1.5.2.	Sequenzierung von <i>ETV6/RUNX1</i>	73
3.1.5.3.	Quantifizierung der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression.....	73
3.1.5.4.	Nachweis der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression im Western Blot	74
3.2.	Untersuchung des Effekts der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression in BaF3-Zellen .	75
3.2.1.	Proliferation.....	76
3.2.2.	Apoptose und Nekrose.....	77
3.2.3.	Zellzyklusverteilung.....	78
3.2.4.	Genexpressionsanalyse.....	79
3.2.4.1.	Genliste.....	79
3.2.4.2.	Überrepräsentationsanalyse	79
3.2.4.3.	Vergleich der Genexpressionsdaten muriner und humaner Proben	80
3.2.4.4.	Transkriptionsfaktorbindungsstellen-Analyse.....	82
3.2.5.	Auswahl differenziell exprimierter Gene für funktionelle Untersuchungen.....	85
3.2.6.	Validierung der Genexpressionsdaten mittels real time PCR.....	86
3.2.7.	Nachweis der differentiellen Expression auf Proteinebene	88
3.2.7.1.	Durchflusszytometrische Analyse der CXCR2-Expression	88
3.2.7.2.	IL-6-ELISA	89
3.2.8.	Proteomanalyse	90

3.3.	Funktionelle Untersuchung hinsichtlich ausgewählter differenziell exprimierter Gene	91
3.3.1.	Stimulation der IL-6-Sekretion der BaF3-Klone mit TNF α	91
3.3.2.	SerpinB1a-vermittelte Zytotoxizität gegen TNF α	92
4.	Diskussion.....	93
4.1.	Etablierung eines zellulären Systems mit stabiler <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression	93
4.1.1.	Retroviraler Gentransfer.....	93
4.1.2.	Genetische Veränderung der Vektorsequenz und die Isolierung einzelner BaF3-Klone.....	96
4.1.3.	Funktionalität des TetON-Systems	98
4.1.4.	Validierung der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression in den etablierten BaF3- Klonen.....	100
4.2.	Effekt der <i>ETV6/RUNX1</i> -Expression in BaF3-Zellen	101
4.2.1.	Auswirkung der Expression des Fusionsgens auf zellbiologischer Ebene.....	101
4.2.2.	Auswirkung der Expression des Fusionsgens auf Gen- expressionsebene	104
4.2.3.	Validierung der differentiellen Expression	110
4.3.	Funktionelle Untersuchungen	111
5.	Zusammenfassung	113
6.	Literaturverzeichnis.....	115
7.	Anhang	125
7.1.	DSMZ-Beschreibung der Zelllinien BaF3, TMM und RO	125
7.2.	Oligonukleotide für die PCR.....	125
7.3.	Genlisten.....	128
7.4.	Differenziell exprimierte Proteinspots	132
	Selbständigkeitserklärung	133
	Publikationen	134
	Lebenslauf	135
	Danksagung.....	136

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen von Institutionen:

ALL-BFM	Berlin Frankfurt-Münster Studie zur Behandlung Kinder und Jugendlicher mit akuter lymphoblastischer Leukämie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EBI	European Bioinformatics Institute
EGIL	European Group for Immunologic Classification of Leukemia
GO	Gene Ontology
JASPAR	PSSM-Datenbank
LFGC	Labor für Funktionelle Genomik der Charité, Berlin
WHO	World Health Organization
WTSI	Wellcome Trust Sanger Institute

Abkürzungen:

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AUL	akute unklassifizierbare Leukämie
BAL	biphänotypische akute Leukämie
BCA	Bicinchoninsäure <i>bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTK	Bruton's Tyrosinkinase
BVZ-ALL	B-Vorläuferzell-ALL
CBF	<i>core-binding factor</i>
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CFU	<i>colony forming unit</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytische Leukämie
CMV	Zytomegalovirus
CRE	<i>cAMP-responsive element</i>
CSF1R	<i>colony-stimulating factor 1 receptor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EFS	ereignisfreies Überleben
ETS	<i>E26 transformation specific</i>
ETV6	<i>E26 variant 6</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
fdr	<i>false discovery rate</i>
FKS	fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLH	<i>helix-loop-helix</i>
HPC	hämatopoetische Vorläuferzelle (<i>hematopoietic progenitor cell</i>)
HSC	hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
IAA	Iodoacetamid

ID	inhibitorische Domäne
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosidase
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
LDS	<i>lithium dodecyl sulfate</i>
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>loss of heterozygosity</i>)
LTR-HSC	<i>long term repopulating-hematopoietic stem cell</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MOI	(<i>multiplicity of infection</i>) Anzahl der Viruspartikel pro Zielzelle
MoMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NCoR	nukleärer Ko-Repressor (<i>nuclear co-repressor</i>)
NP-40	Nonidet P-40
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PDGFR β	<i>platelet derived growth factor receptor β</i>
PE	Phycoerythrin
PIC	Protease Inhibitor Complete
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PMS	<i>phenazine methosulfate</i>
PNT	Pointed-Domäne
PSC	Pefabloc SC
PSSM	position site score matrix
PTK	Proteintyrosinkinase
RHD	<i>runt homology domain</i>
rTetR	reverser Tet-Repressor
rtTA	reverser Transaktivator
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SNP	single nucleotide polymorphism
TAD	transaktivierende Domäne
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TRE	<i>tetracyclin responsive element</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
VSV-G	<i>Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosidase

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Leukämien

Unter dem Begriff Leukämien werden verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die durch maligne Transformation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen entstehen. Gemeinsames Merkmal ist die klonale Proliferation und Akkumulation unreifer Blutzellen in Knochenmark und Blut sowie häufig auch in lymphatischen Geweben. Die Symptome der Erkrankung resultieren aus der Verdrängung und Unterdrückung der normalen Hämatopoese und der Beeinträchtigung des Immunsystems.[1]

Die Unterteilung erfolgt nach dem transformierten Zelltyp in myeloische und lymphatische Leukämie, nach dem Differenzierungsgrad in reifzellige und unreifzellige Leukämie und nach dem klinischen Verlauf in akute und chronische Leukämie.[2]

Die Inzidenz der Leukämie beträgt in Deutschland etwa 8 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner / Jahr und verteilt sich zu 50% auf die akuten und zu 50% auf die chronischen Formen. Die Häufigkeitsverteilung akuter Leukämien ist zweigipfelig, mit einem Maximum im Kindesalter (bis 15 Jahre) und einem ab 60 Jahren. Dabei überwiegt im Kindesalter die akute lymphatische Leukämie (ALL), im Erwachsenenalter dagegen die akute myeloische Leukämie (AML). Die chronischen Formen treten fast ausschließlich bei Erwachsenen auf.[1, 3]

Die genaue Ursache für die Erkrankung ist in den meisten Fällen unklar. Bekannte prädisponierende Faktoren sind hereditäre genetische Veränderungen (Trisomie 21, Ataxia teleangiectasia, Klinefelter-Syndrom, bestimmte Keimbahn-Polymorphismen im *MTHFR*-Gen), somatisch erworbene zytogenetische Veränderungen, der Kontakt mit chemischen Substanzen wie Benzol und anderen organischen Lösungsmitteln, sowie Zytostatika (Topoisomerase-II-Hemmer), Infektion mit HTLV-1 und hämatologische Grunderkrankungen, die in Leukämien übergehen können. Ein direkter Zusammenhang konnte zwischen radioaktiver Strahlung und insbesondere der Entstehung akuter Leukämien gezeigt werden.[4, 5] Seit Beginn des 20. Jahrhunderts hat sich die Häufigkeit der ALL bei Kindern zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr charakteristisch erhöht, jedoch nur in industrialisierten Ländern und Regionen. Das weist darauf hin, dass Leukämien bei Kindern mit einem höheren

sozioökonomischen Status assoziiert sind und lässt vermuten, dass Infektionen und das Immunsystem eine Rolle bei ihrer Entwicklung spielen.[6]

Molekulare Untersuchungen leukämischer Zellen in Zwillingen anhand spezifischer Marker und das Screening neonataler Blutproben haben gezeigt, dass akute Leukämien bereits *in utero* initiiert werden.[7, 8] Während das pränatale Ereignis zur Leukämie bei Neugeborenen führt, entwickeln sich Leukämien bei älteren Kindern in mehreren Schritten. Die mitunter lange Latenzzeit bis zum Auftreten der Leukämie und die Tatsache, dass leukämiezellspezifische Fusionstranskripte in bis zu 1% der Blutproben Neugeborener nachgewiesen werden können, sprechen dafür, dass *in utero* ein prä-leukämischer Klon entsteht und weitere, postnatale Ereignisse notwendig sind, um in einem Teil dieser Kinder zur Ausbildung einer Leukämie zu führen.[9] Dieses Konzept der mehrstufigen Tumorentwicklung ist auch für andere Neoplasien bekannt.[10]

1.2. ALL im Kindesalter

Maligne Erkrankungen sind insgesamt bei Kindern selten. Leukämien sind mit gut einem Drittel die häufigste maligne Neoplasie im Kindesalter.[11] Dabei handelt es sich fast ausschließlich um die akuten Formen. Die ALL macht mit 80% den Hauptteil akuter Leukämien im Kindesalter aus, der Anteil der AML beträgt knapp 20%. Bei den restlichen Fällen handelt es sich um die im Kindesalter sehr seltene CML, akute unklassifizierbare Leukämie (AUL) und biphänotypische akute Leukämie (BAL). Somit ist die ALL die am häufigsten diagnostizierte maligne Erkrankung im Kindesalter.

Sowohl klinische Daten, als auch immunphänotypische, zyto- und molekulargenetischen Untersuchungen der leukämischen Blasten haben gezeigt, dass es sich bei der ALL um eine biologisch heterogene Erkrankung handelt. In der Folge wurden verschiedene Klassifizierungssysteme der ALL entwickelt, die das Ziel verfolgen, die differenzialdiagnostische Unterscheidung der verschiedenen Subtypen akuter Leukämien zu erleichtern und gleichzeitig klinische und biologische Entitäten, häufig mit Bedeutung für die Therapieentscheidung sowie prognostischer Relevanz, zu beschreiben. Die aktuelle WHO-Klassifikation von Tumoren hämatopoetischer und lymphatischer Gewebe (2001) definiert Krankheits-Entitäten anhand

morphologischer, immunphänotypischer, genetischer und klinischer Merkmale, wobei der Einfluss der Merkmale je nach Erkrankung variiert.[12]

Die alterstandardisierte Inzidenz akuter Leukämien liegt bei 4 Neuerkrankungen / 100.000 Kindern (bis 15 Jahre) pro Jahr. Demnach werden in Deutschland jährlich 600 Kinder mit initialer Leukämie diagnostiziert.[11] Unbehandelt führen akute Leukämien innerhalb weniger Wochen zum Tode.

Dank moderner Polychemotherapien können heute mehr als 80% der Kinder mit ALL erfolgreich therapiert werden. Diese guten Ergebnisse sind auf eine konsequente Optimierung der Therapien während der letzten 40 Jahre zurückzuführen.[13, 14] Ein wesentlicher Fortschritt liegt in der risikoadaptierten Therapie der Patienten. Diese werden anhand prognostischer Faktoren in Risikogruppen eingeteilt (stratifiziert), innerhalb derer eine spezifische Behandlung erfolgt. Da knapp 20% der therapierten Kinder ein Rezidiv erleiden und gleichzeitig durch immer aggressivere Therapien das Risiko sekundärer maligner Neoplasien (hauptsächlich AML und ZNS-Tumoren) und anderer Komplikationen steigt,[15, 16] ist das Hauptziel von Therapieoptimierungsstudien weiterhin eine Verbesserung der Überlebensrate bei gleichzeitiger Verringerung der Toxizität.

1.2.1. Immunphänotypen der ALL

Mit dem Einsetzen der immunphänotypischen Untersuchung leukämischer Blasten Ende der 70er Jahre zeigte sich sehr bald, dass die Phänotypen der meisten malignen Lymphozyten die Charakteristika normaler Lymphozyten reflektieren und dass die ALL in jedem Reifungsstadium der normalen lymphatischen Differenzierung auftreten kann.[17] Mittels Immunphänotypisierung erfolgt deshalb eine Zuordnung der Blasten zur B- oder T-Zellreihe, sowie eine weitere Unterteilung der ALL entsprechend des Differenzierungsgrades.[18, 19]

In den meisten Fällen zeigen ALL-Blasten Merkmale der Differenzierung von B-Vorläuferzellen (BVZ-ALL, 82%), seltener von T-Zellen (15%) oder reiferen B-Zellen (3%) (s. Tab. 1.1). Nach einer 1995 von der EGIL (European Group for Immunologic Classification of Leukemia) veröffentlichten Klassifizierung, wird die heterogene Gruppe der B-Vorläuferzell-ALL zusätzlich in die weitestgehend undifferenzierte pro-B-ALL (5%), in die common ALL (cALL, 61%) und die am weitesten differenzierte prä-B-ALL (16%) unterteilt. Die T-ALL wird in pro-T-, prä-T-, kortikale und reife T-ALL unterteilt.[20]

Tab. 1.1: Immunphänotypen der ALL und ihre charakteristischen Antigene

Progenitorzell-Antigene: TdT, CD10; B-Zell-Antigene: CD19, CD22, CD79 α , c μ , slg; T-Zell-Antigene: CD3 (c/s), CD2, CD5, CD7, CD1a

Immunphänotypen der B-ALL (85%):		TdT	CD19/22/79 α	CD10	c μ	slg
BVZ (82%)	pro-B 5%	+	+	-	-	-
	common 61%	+	+	+	-	-
	prä-B 16%	+	+	+/-	+	-
reife B (Burkitt) (3%)		-	+	+/-	-	+
Immunphänotypen der T-ALL (15%):		TdT	CD3	CD2/5/7	CD4/CD8	CD1a
pro-T		+	c	+/-	-	-
prä-T		+	c	+	+	-
kortikale T		+	c/s	+	+	+
reife T		+/-	s	+	4 od. 8	-

Wegen der weltweit uneinheitlichen immunphänotypischen Subklassifizierung der BVZ-ALL und ihrer umstrittenen prognostischen Relevanz, nimmt die WHO keine weitere immunphänotypische Gliederung der Vorläuferzell-ALL vor.[5] Es erfolgt eine Gruppierung anhand struktureller Aberrationen und Ploidie. Diese Einteilung ist prognostisch relevant und wird, insbesondere bei Kindern mit ALL, auch zur Stratifizierung der Therapie herangezogen.[21]

In 5 - 40% der ALL können die Blasten eindeutig der lymphatischen Zellreihe zugeordnet werden, exprimieren jedoch zusätzlich myeloische Antigene. Diese Fälle werden als My⁺ALL bezeichnet. Die häufigsten exprimierten myeloischen Marker sind CD13 und CD33.[22]

1.2.2. Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei ALL

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde vermutet, dass chromosomale Veränderungen eine Rolle bei der Entstehung von Neoplasien spielen.[23] Erst 1960 gelang der Beweis, als Nowell und Hungerford erstmals eine spezifische

Chromosomenanomalie, das Philadelphia-Chromosom, in Verbindung mit CML nachwiesen.[24] Die Verbesserung zytogenetischer Techniken und die Einführung molekulargenetischer Methoden in den 70er bzw. 80er Jahren führte schließlich zur Identifizierung einer Vielzahl somatisch erworbener genetischer Veränderungen in leukämischen Blasten und ermöglichte die Identifizierung der betroffenen Gene. Besonders auffällig war die Häufigkeit rekurrenter chromosomaler Translokationen.[25] 1978 zeigten Secker-Walker et al. in einer Studie über ALL bei Kindern erstmals, dass genetische Veränderungen prognostische Relevanz besitzen.[26]

Veränderungen des Karyotyps sind bei mehr als 90% der ALL im Kindesalter in den leukämischen Blasten nachweisbar. Dabei kann sowohl die Anzahl der Chromosomen (Ploidy), als auch ihre Struktur betroffen sein.[27] Die häufigste numerische Aberration, ist die Hyperdiploidie mit ≥ 51 Chromosomen, die in bis zu 30% der BVZ-ALL auftritt und mit einer guten Prognose assoziiert ist.[26] Hypodiploidie (≤ 45 Chromosomen) tritt in etwa 6% der ALL auf und ist insgesamt mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dabei zeigt sich die Tendenz zu einer schlechteren Prognose mit abnehmender Chromosomenzahl.[28] Strukturelle chromosomale Aberrationen treten in 75% der ALL bei Kindern auf.[29] Am häufigsten handelt es sich um Translokationen, seltener um Inversionen, Deletionen und Amplifikationen. 50% der ALL weisen rekurrente Translokationen auf (s. Tab. 1.2).[30] In vielen Fällen zeigt sich, dass ALL-Immunphänotypen mit spezifischen Aberrationen assoziiert sind.

Tab. 1.2: Verteilung rekurrenter Translokationen bei ALL im Kindesalter, sowie betroffene Gene, assoziierte Immunphänotypen und die Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens (EFS)

Translokation	beteiligte Gene	Häufigkeit bei Erst-erkrankungen	assoziierter Immun-phänotyp	pEFS (3 – 5 J.)	Ref.
t(4;11)(q21;q23) t(1;11)(p32;q23) t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL</i> -Fusionen	5%	pro-B, selten T	9 Monate medianes Überleben	[31]
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML1</i>	25%	common B, prä-B	85 – 90%	[14, 32]
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	4%	prä-B	20 – 40%	[27, 33]
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX</i>	6%	prä-B	70 – 80%	[29]
t(17;19)(q22;p13)	<i>E2A/HLF</i>	1%	pro-B	< 10%	[29]
Translokationen von 8q24	Dysregulation von <i>MYC</i>	2%	reife B-Zell	75 – 85%	[29, 34]
Translokationen von 14q11 (<i>TCRα/δ</i>) und 7q35 (<i>TCRβ</i>)	Dysregulation von <i>TAL, LYL, HOX11, LCK, LMO1, LMO2</i> u.a.	7%	T-Zellreihe	65 – 75%	[35, 36]
zufällig	-	25%	-	-	-
keine	-	30%	-	-	-

Neue Maßstäbe bei der Detektion von genetischen Veränderungen und der Identifizierung betroffener Gene wurden durch die 1992 entwickelte Comparative Genomic Hybridization (CGH) gesetzt.[37] Dabei werden genomweit chromosomale Veränderungen detektiert, die durch Zugewinn oder Verlust von DNA-Sequenzen entstehen. Mittels hochauflösender Array-CGH (HR-CGH) sind heute submikroskopische Veränderungen von < 100 b detektierbar und es konnte gezeigt werden, dass genetische Veränderungen mit leukämogenetischer Relevanz häufig submikroskopisch sind.[38-40] Mit SNP-Arrays (single nucleotide polymorphism arrays) kann zusätzlich Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) detektiert werden. Die Analyse pädiatrischer ALL-Proben mit SNP-Arrays zeigte, dass diese durchschnittlich sechs chromosomale Veränderungen, die die Kopienzahl betreffen, aufweisen. Die Anzahl der Veränderungen korreliert mit den ALL-Subtypen. Deletionen treten doppelt so häufig auf wie Amplifikationen. Es wurden 54

neue Regionen rekurrenter somatischer Deletionen identifiziert. Von diesen betroffen waren u.a. tumorassoziierte Gene wie *CDNK2A* (9p21.3), *ETV6* (12p13), *ATM* (11q23) und *RB1* (13q14.2). Die Studie zeigte außerdem, dass in 40% der BVZ-ALL Gene betroffen sind, die bei der B-Zell-Entwicklung eine Rolle spielen. Allein in 30% der Fälle involvierten die Veränderungen *PAX5* oder Teile des Gens und resultierten in *PAX5*-Haploinsuffizienz.[41, 42]

In der Klinik werden klon- und leukämiespezifische Genveränderungen als Marker zum Nachweis von restlichen Leukämiezellen (minimal residual disease, MRD) zur Beurteilung des Krankheits- bzw. Heilungsverlaufs genutzt (s. Abschnitt 1.2.4).

1.3. Molekulare Pathogenese von Leukämien

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die zur Ausbildung von Leukämien führen, sind bisher nur in Ansätzen bekannt. Die Charakterisierung der in leukämischen Zellen auftretenden spezifischen zytogenetischen Veränderungen führte zur Identifizierung vieler Genen, die für die Leukämogenese von Bedeutung sind.

Genetische Veränderungen können grundsätzlich durch zwei Mechanismen zur Transformation der Zelle beitragen: die Aktivierung von Onkogenen, sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Beide Gentyphen sind normaler Bestandteil des Genoms. Protoonkogene üben in der Regel zentrale Funktionen bei der Steuerung der Proliferation aus. Es handelt sich vor allem um Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Durch genetische Veränderungen werden die Protoonkogene zu Onkogenen umgewandelt. Die Aktivierung kann sowohl regulatorisch, als auch strukturell erfolgen und wirkt sich dominant auf den Phänotyp der Zelle aus. Tumorsuppressorgene besitzen hingegen wachstumshemmende und differenzierungsinduzierende Eigenschaften und blockieren so die Entwicklung von Tumoren. Deletionen und Punktmutationen führen häufig zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen. Da Tumorsuppressorgene rezessiv sind, ist LOH für die Ausbildung des malignen Phänotyps erforderlich, beispielsweise durch Deletion des 2. Allels.[43]

Translokationen und Inversionen treten in 75% der ALL bei Kindern auf und führen durch zwei Mechanismen zur onkogenen Aktivierung von Genen: Gelangen die translozierten Gene unter die Kontrolle regulatorischer Elemente der Immunglobulin-

oder T-Zellrezeptorgene, führt das zur Dysregulation ihrer Expression. Weitaus häufiger kommt es jedoch zur Fusion kodierender Sequenzen zweier Gene und somit zur Bildung spezifischer Onkogene, wobei die chimären Proteine oftmals neue Funktionen aufweisen.[44]

Translokationen korrelieren häufig mit bestimmten Leukämie-Phänotypen, was vermuten lässt, dass sie eine Rolle bei der Leukämogenese spielen.[45] Auch Unterschiede in der Genexpression bei Leukämien mit verschiedenen chromosomalen Aberrationen zeigen, dass bestimmte Aberrationen spezifische Leukämien charakterisieren.[46] Von genetischen Aberrationen betroffene Gene sind häufig an zellregulatorischen Signalwegen beteiligt, die Proliferation, Differenzierung und Apoptose kontrollieren. Veränderte Gene bzw. Fusionsgene führen zur Dysregulation dieser Prozesse und somit zur Störung der Entwicklung und Homöostase hämatopoetischer Zellen.[47] In den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, in denen genetische Veränderungen vermutlich auftreten, kommt es aufgrund dessen zur Fehlregulation des Selbsterneuerungspotentials und der Differenzierung, was letztendlich in der Leukämie resultiert. Dabei findet die Transformation der Zelle schrittweise statt und die Effekte mehrerer Mutationen kumulieren.[48]

Am häufigsten sind Transkriptionsfaktoren von Translokationen betroffen, was darauf hindeutet, dass eine Veränderung der Genexpression der Leukämogenese zu Grunde liegt.[44] Genmanipulationen in Mäusen haben gezeigt, dass viele der involvierten Transkriptionsfaktoren eine essenzielle Rolle in der normalen Hämatopoese spielen.[49]

1.4. Die Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1

1.4.1. Transkriptionsfaktor ETV6

1.4.1.1. Genstruktur von ETV6

ETV6 (*ETS variant 6*), auch bekannt als *TEL* (*translocated ETS leukemia*), wurde ursprünglich als Fusionspartner des Gens *PDGFR β* (Plättchen-assoziiierter Wachstumsfaktorrezeptor β) identifiziert, das infolge der Translokation t(5;12) bei chronischer myelomonozytischer Leukämie (CMML) rearrangiert wird.[50] Das Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p) lokalisiert und umfaßt 240 kb und 9 Exons, wobei sich ein alternatives Exon 1b im zweiten Intron befindet.

Verschiedene Polyadenylierungssignale führen zur Expression mehrerer RNA-Transkripte mit variablen 3'-UTRs. *ETV6* kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein mit einer PNT(pointed)-Domäne, die von den Exons 3 und 4 kodiert wird und einer ETS-Domäne, die von den Exons 6 – 8 kodiert wird. Bisher wurden 6 Spleißvarianten beschrieben, von denen zwei keine PNT-Domäne kodieren und eine keine ETS-Domäne.[51-53] Der Promotor weist weder CAAT- noch TATA-Box auf und das Gen wird, wie viele Gene dieser Art, ubiquitär exprimiert. Neben Konsensussequenzen für SP1 und AP2 wurden in den Enhancer- und Silencerregionen von *ETV6* Bindungsstellen für GATA, STAT, RUNX1, MZF1 und Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie identifiziert, die eine Rolle bei der Hämatopoese und Angiogenese spielen.[54]

Ein homologes Gen, *TEL-B (TEL-2)* wurde im Locus 6p21 identifiziert.[55, 56]

1.4.1.2. ETV6-Protein und Funktion

ETV6 gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, von denen über 30 Mitglieder in Säugern identifiziert wurden. Sie zeichnen sich durch eine konservierte ETS-Domäne (*E26 transformation specific sequence*) aus, die eine WHTH-Struktur ausbildet und die Bindung an purinreiche DNA-Sequenzen mit der zentralen Konsensussequenz 5'-GGAA/T-3' vermittelt.[57] Eine Untergruppe der ETS-Familie bilden Mitglieder mit zusätzlicher PNT-Domäne, die ebenfalls evolutionär konserviert ist. Dazu gehören u.a. *ETV6*, *TEL-B*, *Ets-1*, *Ets-2*, *Erg*, *Fli-1*, *GABP α* und die Drosophila-Proteine *Yan* und *Pointed*. Die PNT-Domäne besteht aus vier bis fünf α -Helices und bildet eine globuläre Struktur aus, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und speziell bei *ETV6* und *TEL-B* Oligomerisierung ermöglicht.[58, 59] *ETV6* formt sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit *TEL-B* und *Fli-1*.[60]

Zwei alternative Startcodons in der *ETV6*-mRNA führen zur Translation von zwei Proteinisoformen, die aus 452 (M1) und 409 (M43) Aminosäuren bestehen, wobei *ETV6*-M1 in den meisten Zelltypen stärker exprimiert wird. Beide Isoformen enthalten die N-terminale PNT-Domäne, sowie die C-terminale ETS-Domäne, jedoch fehlt *ETV6*-M43 eine N-terminale MAPK-Konsensussequenz.[61]

Im Zusammenspiel mit anderen Transkriptions- oder Ko-Faktoren regulieren ETS-Proteine eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie Wachstum, Apoptose, Entwicklung, Differenzierung und onkogene Transformation.[62] Bei den meisten ETS-Proteinen

handelt es sich um Transkriptionsaktivatoren, nur wenige wirken als transkriptionelle Repressoren, unter ihnen auch ETV6.[63] Die repressorische Funktion von ETV6 wird durch unterschiedliche Regionen und HDAC-abhängige und -unabhängige Mechanismen vermittelt (s. Abb. 1.1).[64-66] Bekannte Zielgene von ETV6 sind *FLI-1*, *Id1*, *Stromelysin-1* und *Bcl-X_L*. [67-70]

Häufig stehen ETS-Proteine als nukleäre Ziele am Ende von Ras-MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskaden (Wachstumsfaktoren, zellulärer Stress). Auch ETV6 wird mehrfach phosphoryliert und seine transkriptionelle Repressor-Aktivität durch die MAP-Kinasen p38 und ERK negativ reguliert (s. Abb. 1.1).[71, 72] Eine weitere Regulation findet durch Sumoylierung von ETV6 und nukleären Export statt.[73, 74] Die Sumoylierung führt außerdem zu einer Aggregation des Transkriptionsfaktors in sogenannten TEL- bzw. Kern-Körperchen während der S1-Phase des Zellzyklus.[75] v-Src reguliert über die N-terminalen 42 Aminosäuren spezifisch die Aktivität der größeren ETV6-Isoform. Die Expression von v-Src führt zur Delokalisation von ETV6-M1 vom Kern ins Zytoplasma und zur Abnahme seiner Repressor-Aktivität.[76]

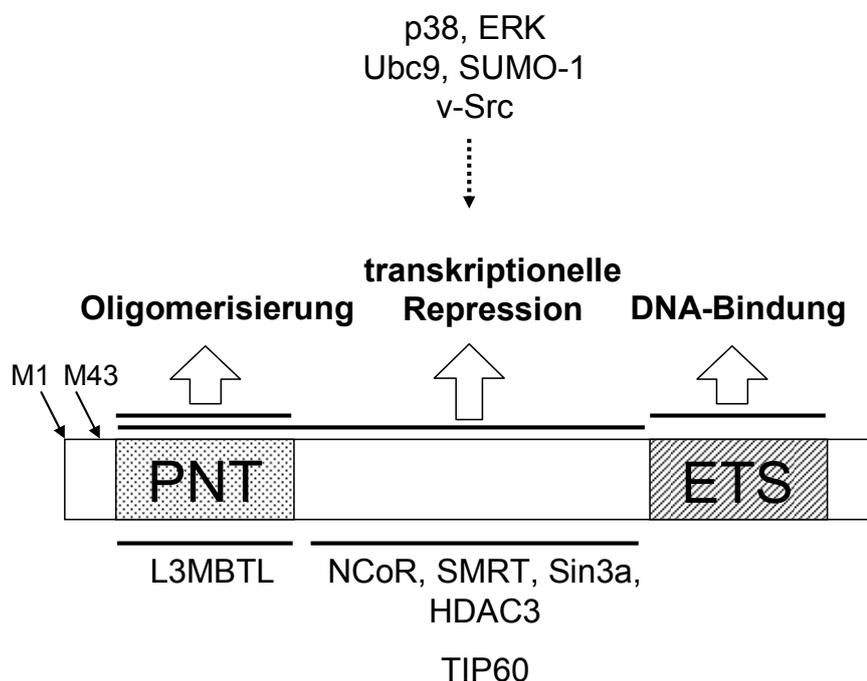


Abb. 1.1: Der Transkriptionsfaktor ETV6 mit den wichtigsten Domänen und ihren Funktionen, sowie interagierende Proteine

ETS-Proteine spielen eine Rolle bei vielen Entwicklungsprozessen während der Embryogenese und in adulten Tieren.[77] ETV6 wird in vielen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Geweben exprimiert. ETV6-Knock-Out-Mäuse sterben an

Tag 10,5 – 11,5 aufgrund defekter Angiogenese im Dottersack und der Apoptose von Zellen in spezifischen Regionen.[78] Weitere Versuche haben gezeigt, dass ETV6 essenziell für die Ausbildung aller hämatopoetischer Zellreihen bei der adulten Hämatopoese im Knochenmark ist, wohingegen die primitive Hämatopoese im Dottersack und die fetale definitive Hämatopoese in der Leber auch ohne Expression von ETV6 normal verlaufen.[79] Es wird vermutet, dass ETV6 die Interaktion hämatopoetischer Stammzellen mit dem Knochenmarkstroma beeinflusst. Die Inaktivierung von ETV6 in adulten Mäusen führt zu einer Abnahme hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark.[80] Während der zelllinienspezifischen Entwicklung weist ETV6 regulatorische Funktion bei der Entwicklung von Myelozyten auf, fördert die Differenzierung von Erythrozyten und hemmt die Differenzierung von Megakaryozyten.[81-83] Durch die Heterodimerisierung mit Fli-1 unterdrückt ETV6 dessen Funktion als Transkriptionsaktivator megakaryozytenspezifischer Promotoren. Beide Transkriptionsfaktoren werden während der frühen Hämatopoese exprimiert. Eine komplette Hemmung von Fli-1 wird nur durch das gesamte ETV6-Molekül erreicht. Die Unfähigkeit von ETV6-Fusionsproteinen, die transkriptionelle Aktivität von Fli-1 zu hemmen, könnte demnach zu einem malignen Phänotyp beitragen.[60]

Neben seiner Rolle als hämatopoetischer Regulator, wird ETV6 eine Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben. Der differenzierungsfördernde Effekt von ETV6 in murinen Erythroleukämiezellen kann durch Ko-Expression einer dominant negativen ETV6-Mutante blockiert werden.[82] Die Expression von ETV6 in *ras*-transformierten NIH-3T3-Zellen hemmt deren Wachstum in Softagarkultur und die Expression der Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1.[69] Native NIH-3T3-Zellen, die ETV6 exprimieren, weisen in serumfreier Kultur eine verstärkte Apoptose auf, was wohl auf die transkriptionelle Repression des anti-apoptotischen Gens *Bcl-X_L* zurückzuführen ist.[70] Auch in myeloiden Vorläuferzellen reguliert ETV6 die Apoptose. Überexpression in 32Dcl3-Zellen hemmt deren IL-3-induzierte Proliferation und führt während der Induktion der Differenzierung durch Behandlung mit G-CSF zur Apoptose, vermutlich über den p53-Signalweg.[81]

Das am engsten verwandte Proteinhomolog zu ETV6 ist TEL-B. Die Expression von TEL-B in verschiedenen leukämischen Proben, inklusive solcher mit komplettem ETV6-Verlust, zeigt, dass ETV6 und TEL-B nicht redundante Funktionen haben.[56]

1.4.1.3. Veränderung von ETV6 bei Leukämien

Zytogenetische Veränderungen von 12p sind in einer Vielzahl maligner hämatopoetischer Erkrankungen (ALL, AML, MDS) beschrieben. Meist handelt es sich dabei um balanzierte Translokationen, und molekulargenetische Studien haben gezeigt, dass in mehr als der Hälfte dieser Fälle *ETV6* involviert ist.[84] Mittlerweile wurden mehr als 40 Translokationspartner von *ETV6* identifiziert (s. **Abb. 1.2**). Von einigen ist bekannt, dass sie eine essenzielle Rolle während der Hämatopoese spielen, beispielsweise *RUNX1*, mit dem *ETV6* am häufigsten fusioniert.

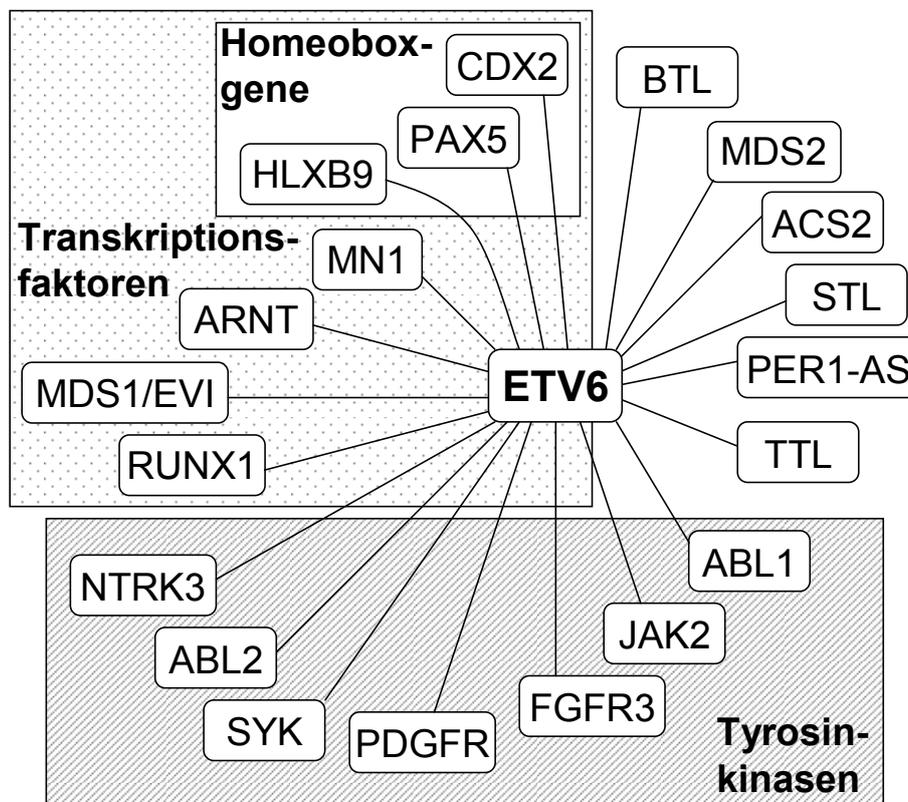


Abb. 1.2: Fusionspartner von ETV6 bei Leukämie-assoziierten Translokationen

Bei einer Reihe von Translokationen fusionieren Proteintyrosinkinase (PTK) vom Rezeptor-Typ (*PDGFR β* , *TRKC*) und Nicht-Rezeptor-Typ (*ABL1*, *ABL2*, *JAK2*, *NTRK3*, *FGFR3*, *SYK*, *ARG*) in charakteristischer Weise mit dem N-terminalen Teil von ETV6. Homodimerisierung über die PNT-Domäne von ETV6 resultiert in der konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase(TK)-Domäne, Autophosphorylierung, sowie der Phosphorylierung zellulärer Proteine, wie RasGAP (*Ras GTPase activating protein*), CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*), Paxillin und STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Eine Fehlregulation nachgeschalteter

Signalwege könnte somit grundlegend für die Leukämogenese sein. Für die meisten ETV6/PTK-Fusionsgene wurde das Transformationspotential, für das eine funktionelle PNT- sowie TK-Domäne essenziell sind, in Zelllinien nachgewiesen. Das leukämogene Potential der *PDGFR β* , *JAK2*- und *ABL*-Fusionen wurde in murinen Knochenmarkstransplantationsmodellen belegt, wo ihre Expression myeloide und lymphoproliferative Erkrankungen, sowie myeloproliferative Syndrome verursachten.[85]

Andere Translokationen führen zur strukturellen und funktionellen Modifikation von Transkriptionsfaktoren (*RUNX1*, *MN1*, *EVI1*, *CDX2*, *PAX5*, *HLXB9*) durch Fusion mit dem N-terminalen oder C-terminalen Teil von *ETV6*. Dysregulation der ursprünglichen Funktion der beiden Partnergene kann hierbei als pathogener Mechanismus für die Entstehung von Leukämien in Patienten mit diesen Translokationen vermutet werden. Fusion von *ETV6* mit *EVI1* infolge der Translokation t(3;12) führt zur Überexpression von *EVI1*, welche vermutlich die Grundlage der Entstehung myeloproliferativer Erkrankungen mit t(3;12) ist.[86] Für die Fusionsgene *MN1/ETV6*, *PAX5/ETV6* und *HLXB9/ETV6* wird eine Dysregulation der Zielgenen von *ETV6* als Mechanismus der Transformation vermutet, da die chimären Proteine die DNA-bindende ETS-Domäne enthalten.[85] Das Transformationspotential von *MN1/ETV6* wurde in NIH-3T3-Zellen nachgewiesen.[87] Die AML-assoziierte Translokation t(12;13) resultiert in der Expression des Fusionsgens *ETV6/CDX2* sowie in der ektope Expression von *CDX2* vom nicht rearrangierten Allel. Als pathogenetischer Mechanismus wurde die ektope Expression des nicht rearrangierten *CDX2*-Allels identifiziert. Transplantation von *ETV6/CDX2*-exprimierenden CD34-positiven Zellen induzierte dagegen keine Leukämie in Mäusen.[88]

Eine weitere Grundlage für die Entstehung von Leukämien könnte der Verlust der Funktion von *ETV6* als Tumorsuppressor sein. In 15 – 22% der ALL werden zusätzlich zu den Translokationen, die *ETV6* involvieren, auch terminale oder interstitielle Deletionen in der chromosomalen Region von *ETV6* gefunden.[89] Einige chimäre Fusionsproteine, z.B. *ETV6/RUNX1* und *ETV6/PTPRR*, interferieren in dominanter Weise mit der Funktion des Wildtyp-*ETV6*, vermutlich durch Dimerisierung mit *ETV6* über die PNT-Domäne.[90, 91]

1.4.2. Transkriptionsfaktor RUNX1

1.4.2.1. Genstruktur von RUNX1

RUNX1, auch *AML1* (*acute myeloid leukemia 1*) und *CBFA2* (*core-binding factor subunit $\alpha 2$*) genannt, wurde als eines von zwei Genen identifiziert, die infolge der AML-assoziierten Translokation t(8,21) rearrangiert werden. Das Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q).[92] Es umfasst 260 kb, besteht aus 12 Exons und besitzt zwei 5'-UTRs und drei 3'-UTRs. Zusätzlich führen alternatives Spleißen und die Verwendung verschiedener Polyadenylierungsstellen zur Expression mindestens 12 verschiedener mRNAs.[93] Alle Transkripte enthalten die *runt homology domain* (RHD), die von den Exons 3 – 5 kodiert wird. Diese hoch konservierte Region zeichnet eine Familie von Genen aus, zu der u.a. die Drosophila-Gene *runt* und *Lozenge*, sowie in Säugern die drei Gene *RUNX1*, *RUNX2* (*AML3 / CBFA1*) und *RUNX3* (*AML2 / CBFA3*) gehören.[94, 95]

RUNX1-Transkripte (und Proteine) können grob in zwei Gruppen unterteilt werden: lange Transkripte, die die RHD und die C-terminale transkriptionsaktivierende Domäne (TAD) enthalten, die von den Exons 11 und 12 kodiert wird, und kurze Transkripte, die nur die RHD enthalten (s. Abb. 1.3).

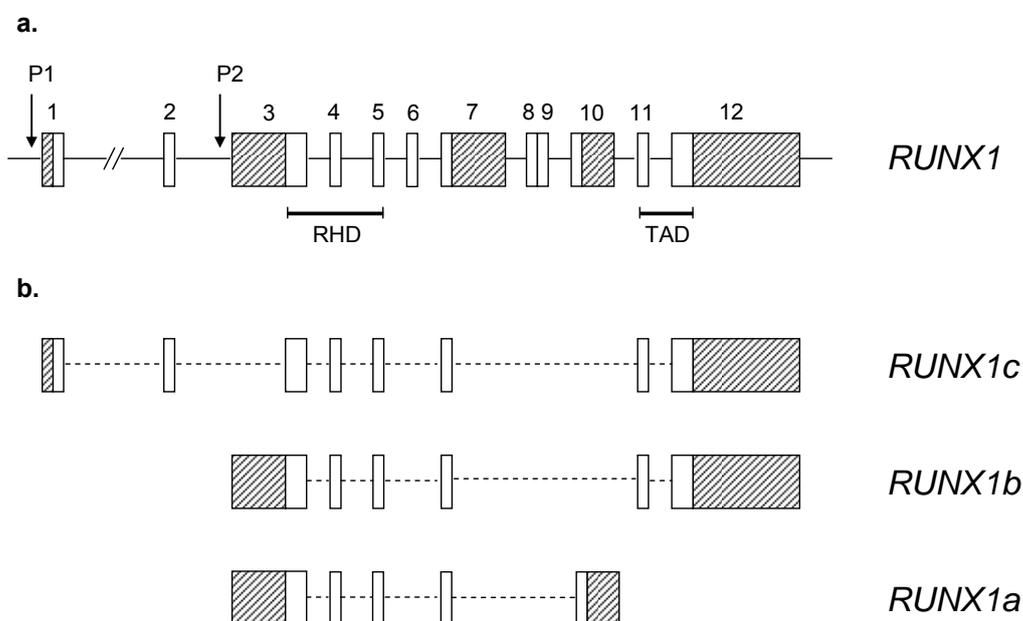


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Genstruktur von *RUNX1* und der häufigsten Transkripte. a. Die Exons des Gens sind nummeriert, schraffierte Teile stehen für UTRs. P1 und P2 kennzeichnen den distalen bzw. den proximalen Promotor. b. *RUNX1a*, b und c sind die drei häufigsten Transkripte, die durch Verwendung der alternativen Promotoren und 3'-UTRs sowie alternatives Spleißen entstehen.

Die Transkription von *RUNX1* wird von zwei distinkten Promotorregionen reguliert (s. Abb. 1.3).[96] Transkripte, die vom proximalen Promotor (P2) exprimiert werden, beginnen mit Exon 3 (z.B. *RUNX1a* und *RUNX1b*), Transkripte vom distalen Promotor (P1) resultieren aus der Verwendung einer internen Spleiß-Akzeptorstelle in Exon 3 (z.B. *RUNX1c*).[97] P2 liegt innerhalb einer CpG-reichen Region. Beide Promotoren enthalten keine TATA-Box, jedoch eine Reihe konservierter Promotorelemente (P1: CCAAT-, E-Box, CRE-, GATA-, RUNX-, Smad-Bindungsmotiv; P2: CCAAT-, GC-Box, Inr, Oct-, Ets-Motiv).[98] Die Aktivität der beiden Promotoren ist während der Embryogenese zeitlich und räumlich reguliert.[99] Die beiden 5'-UTRs wirken als translationale Regulatoren: Transkription von P1 resultiert in einer kurzen 5'-UTR, die Cap-abhängige Translation vermittelt, Transkription von P2 in einer langen 5'-UTR, die eine IRES enthält und Cap-unabhängige Translation vermittelt.[97]

Die *RUNX1*-Homologe *RUNX2* und *RUNX3* liegen beim Menschen auf Chromosom 1p36 bzw. 6q21.[95] Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass die *RUNX*-Gene in Säugern früh entstanden. Während der Evolution blieben große Übereinstimmungen in der genomischen Organisation, der DNA-Sequenz, der Expressionsregulation und der Proteinfunktion erhalten. *RUNX3* ist der evolutionäre Ursprung der *RUNX*-Gene in Säugern.[100]

1.4.2.2. *RUNX1*-Protein und Funktion

Die RHD-Proteine sind eine Familie konservierter Transkriptionsfaktoren. Sie sind Bestandteil heterodimerer Transkriptionsfaktorkomplexe, den sogenannten *core-binding factors* (CBF), die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen. Beim Menschen kodieren *RUNX1*, *RUNX2* und *RUNX3* für α -Untereinheiten und das Gen *CBF β* auf Chromosom 16q22 für die β -Untereinheit.[101] Die *RUNX1*- α -Untereinheit wird während der Entwicklung in hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Zellen der AGM-Region (*aorta-gonad-mesonephros*), in der olfaktorischen und gustatorischen Schleimhaut und neuralen Ganglien exprimiert. Nach der Organogenese beschränkt sich die Expression auf die Zellen des hämatopoetischen Systems. *CBF β* wird hingegen in vielen Geweben exprimiert.[102]

Die konservierte RHD umfasst 128 AS und vermittelt DNA-Bindung, sowie Heterodimerisierung mit der β -Untereinheit (s. Abb. 1.4).[94] Humane *RUNX*-Proteine

binden an DNA-Sequenzen mit der Konsensussequenz 5'-TGT/CGGT-3', die sich als regulatorisches Element in einer Reihe viraler und zellulärer Promotoren, sowie den Promotoren vieler hämatopoesespezifischer Gene befindet. Eine Heterodimerisierung mit CBF β erhöht die DNA-Bindungsaffinität von RUNX1 und ist für die DNA-Bindung essenziell.[101] Sie stabilisiert außerdem das Protein, indem die Ubiquitinierung der RHD und somit der proteasomale Abbau verhindert wird.[103] Die transkriptionelle Aktivität von RUNX1 hängt weiterhin von der Interaktion mit anderen Transkriptions- und Ko-Faktoren ab. RUNX1 organisiert sie in einen Transkriptionskomplex, der die gewebespezifische Expression reguliert.[104] Dabei wirken die kooperierenden Transkriptionsfaktoren meist synergistisch. Viele sind hämatopoesespezifisch, z.B. c-Myb, C/EBP α , Ets-1, PU.1, MEF, HES-1, Pax5, Ikaros und Smad, andere werden ubiquitär exprimiert, wie z.B. AP-1 und CREB1.[105]

Eine transkriptionelle Aktivierung wird durch die Interaktion von RUNX1 bzw. dem Transkriptionskomplex mit den Ko-Aktivatoren p300, CBP (*CREB-binding protein*) und P/CAF vermittelt (s. Abb. 1.4), die HAT-Aktivität besitzen, oder auch mit dem Protein ALY, das den Komplex aus RUNX1, LEF-1 und Ets-1 am Promotor des TCR α stabilisiert.[106] Viele Gene, deren Expression durch RUNX1 aktiviert wird, sind relevant für die Hämatopoese, z.B. GM-CSF, Interleukin-3, CSF1R, Komplementrezeptor Typ 1 (CR1), die Untereinheiten des T-Zellantigenrezeptors (TCR α , β , γ , δ), Integrin CD11a, MDR-1, Myeloperoxidase, Neutrophile Elastase, Granzym B, BLK (B-Zell-spezifische Tyrosinkinase) und c-fos.[105]

Als transkriptioneller Repressor interagiert RUNX1 mit den Ko-Repressoren Sin3A und Sin3B, die wiederum NCoR und HDAC-Komplexe binden oder über ein konserviertes C-terminales VWRPY-Sequenzmotiv mit TLE1-4 (*transducin-like enhancer of split*) (s. Abb. 1.4). Interaktion von RUNX1 mit dem nukleären Hormonrezeptor Ear-2 hemmt die synergistische transkriptionelle Aktivierung durch RUNX1 und C/EBP α . [107]

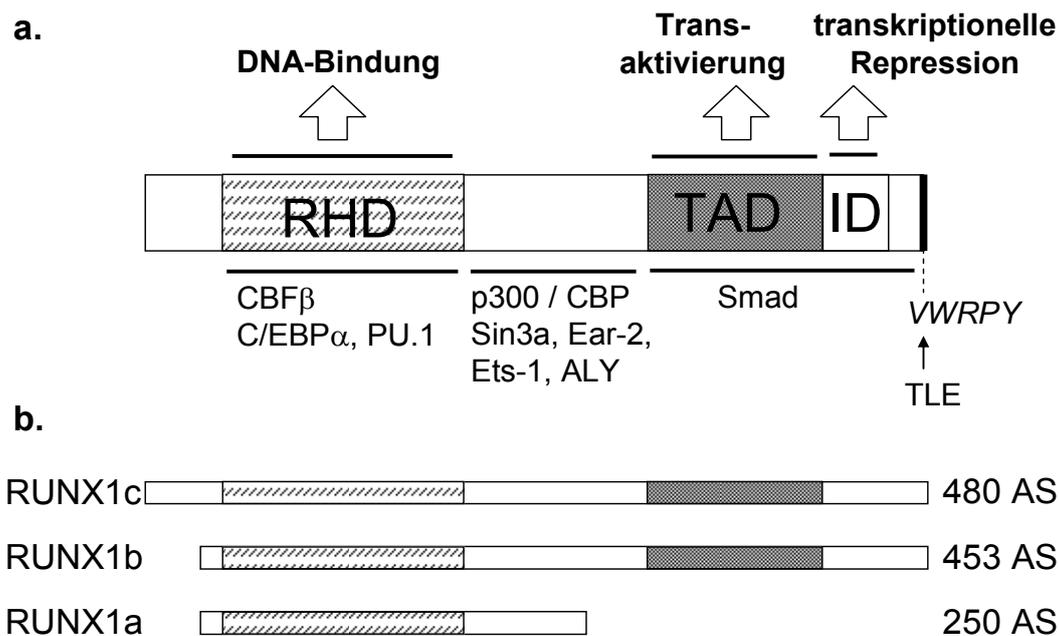


Abb. 1.4: Der Transkriptionsfaktor RUNX1

- a. RUNX1 mit den wichtigsten Domänen und ihren Funktionen, sowie interagierenden Proteinen.
 b. Die drei häufigsten Isoformen RUNX1a, b und c variieren in ihrer Größe und den Domänen.

Die Transkriptionskomplexe sind promotor-spezifisch und abhängig von Zelltyp und Differenzierungsgrad. Das Expressionsmuster der kooperierenden Transkriptions- und Ko-Faktoren reguliert zelltypspezifisch die Expression von RUNX1-Zielgenen. Beispielsweise hemmt RUNX1 die Expression des CDK-Inhibitors $p21^{WAF-1}$ durch Wechselwirkung mit Sin3 in NIH-3T3- und HEL-Zellen, aktiviert den Promotor jedoch in anderen Zelltypen.[108] Auch die Aktivität von RUNX1 selbst wird auf unterschiedliche Weise reguliert, z.B. durch positive und negative Rückkopplungsmechanismen (*RUNX1*-Promotoren enthalten Bindungsstellen für RUNX1, sowie seine Ko-Faktoren und Zielgene) und durch intrinsische inhibitorische Domänen (ID) (s. Abb. 1.4), die die DNA-Bindung und Heterodimerisierung mit CBF β regulieren. Trunkierte RUNX1-Proteine, die die TAD nicht enthalten, hemmen in dominant-negativer Weise die transkriptionelle Aktivität der Isoformen mit TAD.[109] Weiterhin wird die RUNX1-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung reguliert.[110]

RHD-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle während der Embryogenese. Während RUNX1 für die Blut- und RUNX2 für die Knochenbildung essenziell ist, hat RUNX3 eine Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems.[111] *RUNX1*-Knock-Out in Mäusen führt zum kompletten Verlust der definitiven Hämatopoese in der

Leber und zum Tod der Embryonen an Tag 12,5. Zwar verläuft die primitive Hämatopoese im Dottersack normal, jedoch ist RUNX1 für die Ausbildung definitiver HSC vom hämogenen Endothel notwendig.[112, 113] Definitive HSC entstehen aus vaskulären endothelialen Zellen über die Ausbildung hämatopoetischer intra-arterieller Cluster in den Gefäßregionen des Embryos (Dottersack, AGM-Region, Arterien des Dottersacks und der Nabelschnur, Plazenta). Durch Deletion der RUNX1-Aktivität in VEC-positiven endothelialen Zellen konnte gezeigt werden, dass RUNX1 für die Transition der Endothelzellen zu HSC essenziell ist.[114] Die HSC ihrerseits fördern die Gefäßentwicklung durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren. Als weiteren lethalen Entwicklungsdefekt weisen RUNX1-defiziente Mäuse deshalb aufgrund gestörter Angiogenese Blutungen im ZNS auf.[115] Im Adulten ist RUNX1 nicht mehr für die Erhaltung der HSC im Knochenmark, jedoch für ihre Homöostase sowie für die normale Reifung lymphoider und megakaryozytischer Zellreihen notwendig.[116] Homozygote Deletion von *RUNX1* resultiert in einer Zunahme der HSC und myeloider Vorläuferzellen.[117] Somit wirkt der RUNX1/CBF β -Komplex als Schlüsselregulator, der die Ausbildung des gesamten definitiven hämatopoetischen Systems kontrolliert.

Dabei weist RUNX1 isoformspezifische Funktionen auf. Durch die Expression von RUNX1b (mit TAD), jedoch nicht von RUNX1a (ohne TAD) (s. Abb. 1.4), kann die definitive Hämatopoese in RUNX1-defizienten Mäusen und embryonalen Stammzellen wiederhergestellt werden.[118, 119] Während der adulten Hämatopoese weisen die Isoformen adverse Effekte auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen auf. Tsuzuki et al. zeigten, dass die Expression von RUNX1a das Selbsterneuerungspotenzial und die Proliferation primitiver hämatopoetischer Zellen aus dem murinen Knochenmark *in vivo* steigert und RUNX1a-positive LTR-HSC bei Transplantation in lethal bestrahlte Mäuse ein erhöhtes Engraftmentpotenzial aufweisen. RUNX1b-exprimierende LTR-HSC weisen dagegen gar kein Engraftment auf. Weiterhin wurde *in vitro* gezeigt, dass RUNX1a auch in etwas differenzierteren lymphomyeloiden Vorläuferzellen die Proliferation steigert, wohingegen RUNX1b die Differenzierung dieser Zellen fördert.[120] Die ektope Expression von RUNX1a in myeloiden Zelllinien führt zu einem Arrest in der Granulozytendifferenzierung, der jedoch durch Überexpression von RUNX1b aufgehoben werden kann.[121]

Neben dem alternativen Spleißen hat auch die Transkription durch die alternativen Promotoren P1 und P2 grundlegende Effekte für das Repertoire und die Funktion

von RUNX1-Isoformen in der Zelle.[99] RUNX1b (P2) wird während der frühen Embryogenese hochreguliert, während RUNX1c (P1) allmählich hochreguliert und dann gleichmäßig exprimiert wird.[122] Entsprechend wurde in primitiven Erythrozyten nur P2-Aktivität nachgewiesen, in definitiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der AGM und der Arterien des Dottersacks und der Nabelschnur sind P2 und P1 aktiv, wobei die Expression von P2 überwiegt. Nachdem die Zellen in die fetale Leber migriert sind, dominiert die Expression vom distalen Promotor P1.[98] Somit sind beide Promotoren beim Einsetzen der definitiven Hämatopoese aktiv und obwohl beide wichtige, nicht-redundante Funktionen bei der Entwicklung definitiver hämatopoetischer Zellen haben, ist insbesondere die Funktion von P2 kritisch für die definitive Hämatopoese. Beide Promotoren spielen eine Rolle bei der Ausbildung hämatopoetischer Cluster in der dorsalen Aorta. Mäuse, in denen P1 oder P2 inaktiviert wurde, bilden weniger definitive hämatopoetische Vorläuferzellen aus. Dabei ist der Effekt bei Verlust von P2 wesentlich stärker und resultiert in einer Störung der definitiven Hämatopoese in der fetalen Leber sowie der Entwicklung von T-Zellen und führt zum Tod der Individuen kurz nach der Geburt.[99, 123]

Auf zellbiologischer Ebene steuert RUNX1 Zellzyklus und Proliferation und wird seinerseits während des Zellzyklus reguliert. Während des Übergangs von der G1- in die S-Phase nimmt RUNX1 auf Proteinebene zu und stimuliert über die TAD die Zellzyklusprogression.[124] Während der G2/M-Transition induziert die Phosphorylierung von RUNX1 durch Cdk den Abbau des Proteins durch den APC (*anaphase promoting complex*). Die Aktivierung von Cdk4 und Zyklin D3 trägt vermutlich zur Proliferationsstimulation durch RUNX1 bei.[110, 125]

1.4.2.3. Veränderung von RUNX1 bei Leukämien

Die Dysregulation des CBF ist eine der häufigsten Veränderungen in Leukämien und tritt in bis zu 40% aller akuten Leukämien auf.[105] Am häufigsten ist *RUNX1* von Translokationen betroffen. Die häufigsten Translokationen sind die t(8;21)(q22;q22), die in 30% der AML im Kindesalter auftritt und zur Fusion von *RUNX1* mit *ETO* führt und die t(12;21)(p13;q22), die in 25% pädiatrischer B-ALL nachweisbar ist und bei welcher *ETV6* mit *RUNX1* fusioniert. Mittlerweile wurden 32 Partnerchromosomen von Chromosom 21 in Translokationen beschrieben und 17 Partnergene von *RUNX1* auf molekularer Ebene identifiziert.[126] Auch *CBFβ* ist Ziel genetischer Veränderungen und fusioniert infolge der AML-assoziierten inv(16)(p13;q22) mit

SMMHC.^[127] Rekurrente Translokationen, die *RUNX1* involvieren, und die betroffenen Partnergene sind in Abb. 1.5 dargestellt.

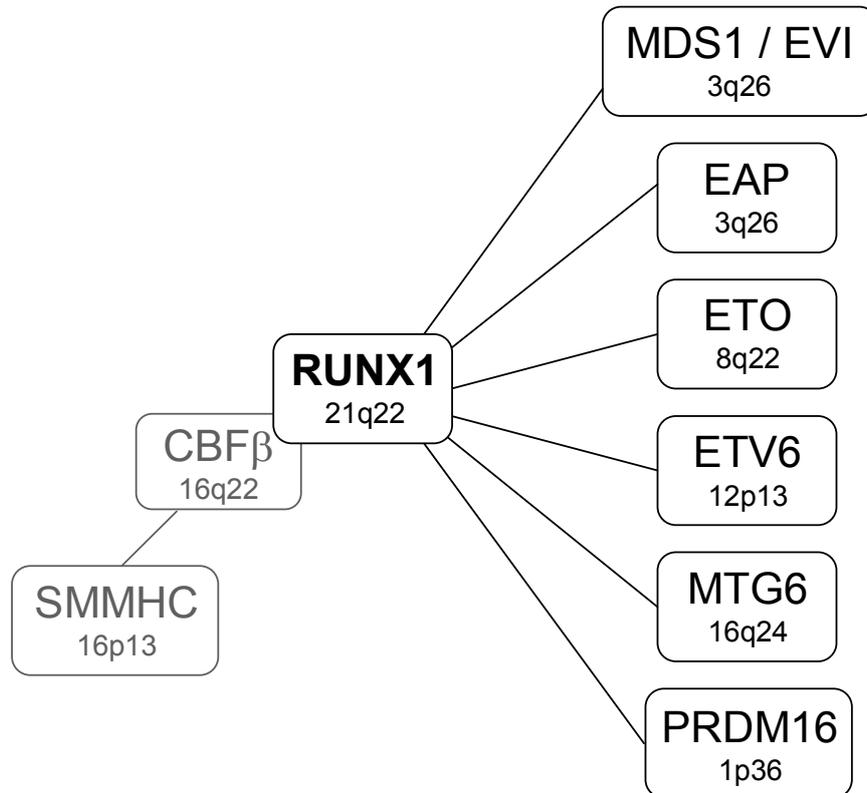


Abb. 1.5: Fusionspartner von *RUNX1* in rekurrenten Translokationen bei Leukämien und MDS

Die meisten Translokationen führen zur Ausbildung von Fusionstranskripten, in denen die 5'-Region von *RUNX1* inklusive der RHD mit der 3'-Region eines Partnergens fusioniert, so dass die TAD von *RUNX1* verloren geht. Diese Klasse von Translokationen ist fast ausschließlich mit myeloiden Leukämien assoziiert. Weiterhin gibt es drei *RUNX1*-Translokationen, die zur Unterbrechung des Leserahmens und zur Termination der mRNA kurz hinter der Fusionsgrenze führen, so dass ein verkürztes *RUNX1*-Protein (inklusive RHD, ohne TAD) exprimiert wird. Bei der Translokation t(12;21) ist dagegen die 5'-Region von *ETV6* mit fast der gesamten *RUNX1*-Sequenz (inklusive RHD und TAD) fusioniert.^[126]

Translokationen führen neben der strukturellen häufig auch zur funktionellen Veränderung der betroffenen Gene und Proteine. *RUNX1*-Fusionsproteine agieren als dominant-negative Inhibitoren von *RUNX1* bei der transkriptionellen Aktivierung und inhibieren die Expression von Genen, die üblicherweise durch *RUNX1* aktiviert werden.^[128, 129] Ursache hierfür ist beispielsweise die aberrante Rekrutierung von Ko-Repressorkomplexen von *RUNX1/ETO* und *RUNX1/MTG16*, statt der üblicherweise von *RUNX1* gebundenen Ko-Aktivatoren p300 und CBP. Auch ist die

Affinität von RUNX1/ETO und RUNX1/EVI1 zu CBF β größer als die des nativen RUNX1.[130] Eine Veränderung des Transkriptom kann somit grundlegend für die Ausbildung von Leukämien in Patienten mit RUNX1-assoziierten Translokationen sein. Es ist aber auch möglich, dass RUNX1-Fusionsproteine durch neu erworbene Eigenschaften zur Leukämogenese beitragen. Beispielsweise inhibiert RUNX1/EVI1 nicht nur die RUNX1-vermittelte Transkriptionsaktivierung, sondern weist auch einen anti-apoptischen sowie einen proliferationsstimulierenden Effekt auf, wobei diese auf den durch EVI1 eingebrachten Zinkfingerdomänen beruhen.[131]

Es spricht vieles dafür, dass *RUNX1*-Translokationen die initiiierenden Ereignisse hämatopoetischer Erkrankungen darstellen und weitere genetische Veränderungen zur Ausbildung der Leukämie notwendig sind. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fusionsgens nicht zur Induktion der Leukämie ausreicht, wohl aber zur Etablierung einer prä-leukämischen Zellpopulation führt, was sich in der Akkumulation früher Vorläuferzellen mit gestörtem Differenzierungspotential ausdrückt.[130, 132] Obwohl *RAS*-, *KIT*- und *Flt3*-Mutationen als genetische Veränderungen regelmäßig in AML mit *RUNX1/CBF β* -Translokationen auftreten, sind in den meisten Patienten die kooperierenden genetischen Veränderungen bislang unbekannt.[132]

1.5. Der chimäre Transkriptionsfaktor ETV6/RUNX1

Die Translokation t(12;21)(p13;q22) wurde erstmals 1994 durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) identifiziert, da sie mit der konventionellen Bänderungstechnik nicht detektierbar ist.[133] Es zeigte sich, dass sie die häufigste rekurrente Translokation bei ALL im Kindesalter ist und in bis zu 25% der BVZ-ALL auftritt.[32, 134, 135] Dagegen ist sie in nur 1% der ALL bei Erwachsenen nachweisbar.[136, 137]

1.5.1. Fusionsgen ETV6/RUNX1

Die Translokation t(12;21) führt zur Fusion von *ETV6* auf Chromosom 12 und *RUNX1* auf Chromosom 21.[138] Der Bruchpunkt liegt im *ETV6*-Gen in Intron 5. Im *RUNX1*-Gen treten die Bruchpunkte in Intron 1 und 2 auf, wobei in fast 90% der Fälle der Bruchpunkt in Intron 1 liegt.[139] Auf dem derivativen Chromosom 21 entsteht

somit ein Fusionsgen, in dem die ersten fünf Exons von *ETV6* mit fast dem gesamten *RUNX1*-Gen fusionieren. Alle Patienten exprimieren das Fusionstranskript *ETV6/RUNX1*, wohingegen das reziproke *RUNX1/ETV6* nur in einigen Fällen nachweisbar ist. Die Expression von *ETV6/RUNX1* erfolgt vom *ETV6*-Promotor. In den Blasten der Patienten lassen sich aufgrund der beiden Bruchpunkte und infolge von Spleißen verschiedene *ETV6/RUNX1*-Transkripte nachweisen. Die meisten Patienten exprimieren das Standard-Transkript mit Exon 2 von *RUNX1*, wenige nur die kurze Form (ohne Exon 2) und einige beide Formen.[140] Es werden eine ganze Reihe weiterer Spleißvarianten exprimiert, die jedoch nur in Verbindung mit den beiden längeren Transkripten auftreten und somit eher eine untergeordnete Rolle spielen.[141] Es ist anzunehmen, dass *ETV6/RUNX1* für ein chimäres Protein kodiert, das eine wichtige Rolle in der Leukämogenese spielt.[142]

1.5.2. ETV6/RUNX1-Fusionsprotein

Das 796 Aminosäuren große Fusionsprotein umfasst die ersten 336 Aminosäuren von *ETV6* und die Aminosäuren 21 – 480 von *RUNX1*. *ETV6/RUNX1* enthält somit die PNT-Domäne, aber nicht die DNA-bindende ETS-Domäne von *ETV6*, sowie die RHD und die TAD von *RUNX1* (s. Abb. 1.6).

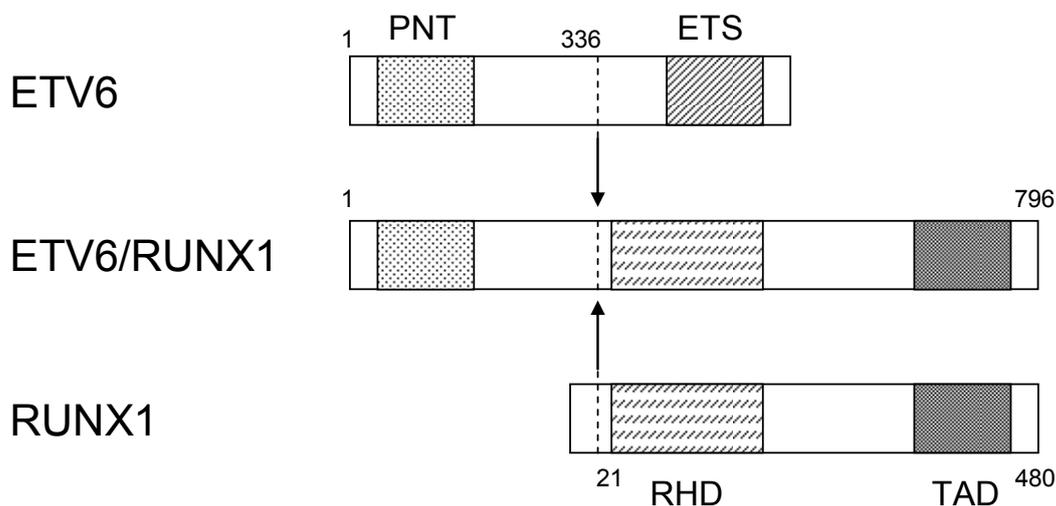


Abb. 1.6: Das Fusionsprotein ETV6/RUNX1

Das in Folge der Translokation $t(12;21)$ entstehende Fusionsprotein ETV6/RUNX1 ist ein chimärer Transkriptionsfaktor, der die PNT-Domäne von ETV6 (Oligomerisierung) sowie die RHD und die TAD von RUNX1 (DNA-Bindung / Heterodimerisierung mit CBF β bzw. transkriptionelle Aktivierung) enthält.

Strukturell unterscheidet sich ETV6/RUNX1 daher von anderen RUNX1-Fusionsproteinen, die nur die RHD enthalten, aber nicht die C-terminalen regulatorischen Sequenzen von RUNX1 (s. 1.4.2.3). Die Funktionen der einzelnen Domänen bleiben im Fusionsprotein weitestgehend erhalten. Über die PNT-Domäne bildet ETV6/RUNX1 *in vitro* Homodimere und Heterodimere mit ETV6.[135] Die RDH ermöglicht es ETV6/RUNX1 einen Komplex mit CBF β zu bilden und über RUNX-Konsensussequenzen spezifisch an die DNA zu binden.[143] Das Fusionsprotein interagiert mit verschiedenen Ko-Repressoren. Die Bindung von NCoR, SMRT und HDAC3 erfolgt durch ETV6, wohingegen ETV6- und RUNX1-Sequenzen die Interaktion mit Sin3a vermitteln.[65, 144, 145] Weiterhin interagiert ETV6/RUNX1 mit dem Ko-Aktivator p300.[146]

1.5.3. Funktion und Einfluss von ETV6/RUNX1 auf Leukämien

Durch eine Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass ETV6/RUNX1 pränatal auftritt und in den meisten Fällen ein frühes, wenn nicht sogar initiierendes Ereignis darstellt.[7, 9] Für die Ausbildung einer Leukämie sind vermutlich zusätzliche genetische Aberrationen notwendig.[147] Um welche weiteren Mutationen es sich dabei genau handelt und wie sie in Kombination mit ETV6/RUNX1 zur Leukämogenese führen, ist unklar. Häufig weisen t(12;21)-positive ALL eine sekundäre Deletion des normalen *ETV6*-Allels auf.[148] Diese resultiert vermutlich in einem selektiven Vorteil für ETV6/RUNX1-exprimierende Zellen, was entweder auf eine Funktion von ETV6 als Tumorsuppressor hindeutet und / oder auf die Fähigkeit von ETV6, durch Heterodimerisierung mit ETV6/RUNX1 dessen transformierende Eigenschaften zu reduzieren.[67, 69] Im Mausmodell wirkte die Deletion von p16/p19 als kooperierendes Ereignis, um in Kombination mit ETV6/RUNX1 zur Ausbildung unspezifischer Leukämien zu führen.[149] Die Relevanz dieser genetischen Veränderung im Kontext ETV6/RUNX1-positiver ALL ist jedoch unklar.

Auf molekularer Ebene kommt es bei der Translokation t(12;21) zur Veränderung der Funktion von ETV6 und RUNX1 als Resultat der Fusion der unterschiedlichen funktionellen Domänen. Die Translokation verwandelt RUNX1 von einem Aktivator in einen transkriptionellen Repressor. Im Gegensatz zu RUNX1 inhibiert ETV6/RUNX1 in transienten Transfektionsversuchen die Aktivität von Reportergenkonstrukten, deren Expression durch regulatorische Sequenzen hämatopoese-spezifischer Gene

gesteuert wird und / oder interferiert bei Koexpression mit der RUNX1-vermittelten Aktivierung dieser Konstrukte.[150-152]

Der genaue Mechanismus, über den das Fusionsprotein diese Aktivität ausübt, wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Deletionsstudien haben gezeigt, dass neben der RHD auch die PNT-Domäne essenziell für die Funktion von ETV6/RUNX1 ist, nukleäre Lokalisation und DNA-Bindung reichen nicht aus. Eine Konkurrenz des WT-RUNX1 und des Fusionsproteins um RUNX-DNA-Bindungsstellen als Mechanismus der ETV6/RUNX1-vermittelten Repression konnte somit ausgeschlossen werden.[153] Stattdessen geht man von einem aktiven Mechanismus aus und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit NCoR-/ HDAC-Komplexen bei der transkriptionellen Aktivität von ETV6/RUNX1 involviert ist und die Repression durch HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A aufgehoben werden kann.[154] Bisher ist unklar, ob die für die Repression benötigte PNT-Domäne selbst als Repressordomäne agiert oder ob Dimerisierung / Oligomerisierung die Ausbildung stabiler Repressor- / Ko-Repressorkomplexe fördert und somit für die transkriptionelle Repression notwendig ist. In einem alternativen Modell interferiert ETV6/RUNX1 durch Sequestrierung von Ko-Aktivatoren ins Zytoplasma indirekt mit der RUNX1-Aktivität.[146, 155] Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass die DNA-Bindung offensichtlich essenziell für die Funktion von ETV6/RUNX1 ist. Eine Mutation der RHD, die die DNA-Bindung spezifisch unterbricht, jedoch weiterhin Bindung von CBF β ermöglicht, führt zum Verlust der Aktivität des Fusionsproteins in B-Vorläuferzellen.[156]

Chakrabarti et al. zeigten, dass die Sumoylierung von ETV6/RUNX1 an der PNT-Domäne wie beim WT-ETV6 zu einer Aggregation des Proteins in sogenannten Kern-Körperchen während der S1-Phase des Zellzyklus führt.[75] Das Expressionsmuster des Fusionsproteins unterscheidet sich somit von dem des WT-RUNX1, gleicht aber dem von ETV6. Die Bedeutung dieser Beobachtung und die Rolle, die ETV6/RUNX1 für den Zellzyklus spielt, sind aber unklar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ETV6/RUNX1 auf molekularer Ebene als konstitutiver, dominant-negativer Repressor agiert, während RUNX1 als regulierter Transkriptionsfaktor fungiert, der je nach Zellkontext die Transkription von Zielgenen aktiviert oder inhibiert. Es ist anzunehmen, dass ETV6/RUNX1 über eine Veränderung des Expressionsmusters von RUNX1-Zielgenen und den dominant-

negativen Effekt auf die RUNX1-Funktion in der hämatopoetischen Entwicklung direkt zur Transformation der Zelle und zur Leukämogenese beiträgt.[154]

Die Fähigkeit von ETV6/RUNX1 durch Dimerisierung in dominanter Weise mit der Funktion des Wildtyp-ETV6 zu interferieren, stellt eine weitere mögliche Grundlage für die Entstehung von Leukämien dar, da das Fusionsprotein auf diese Weise die Funktion von ETV6 als Tumorsuppressor blockieren könnte.[90, 91]

1.6. t(12;21) bei ALL im Kindesalter

Die Translokation t(12;21) ist die häufigste strukturelle Aberration bei ALL im Kindesalter. t(12;21)-positive ALL weisen eine erhöhte Inzidenz zwischen dem 1. – 9. Lebensjahr auf und sind häufig noch mit anderen guten prognostischen Faktoren wie einer niedrigen Leukozytenzahl und einem BVZ-Immunphänotyp assoziiert (meist common, seltener prä-B). In einem Viertel der Fälle werden myeloide Marker ko-exprimiert.[157] *ETV6/RUNX1*-positive Blasten weisen eine erhöhte *in vitro* Sensitivität für Asparaginase, Doxorubicin, Etoposid und Dexamethason auf.[158, 159]

Im Rahmen gegenwärtiger risikoadaptierter Therapien weisen Patienten mit *ETV6/RUNX1*-positiver ALL außerordentlich gute Therapieergebnisse auf. Zur Stratifizierung der Patienten wird *ETV6/RUNX1* aber nicht herangezogen. Im Rahmen der deutschen ALL-BFM-Therapieoptimierungsstudie beträgt die Überlebensrate nach 5 Jahren 100% und die Wahrscheinlichkeit eines EFS (ereignisfreies Überleben) 95%.[14] Amerikanische Studien zeigen ähnlich gute Resultate.[160, 161] In einer aktuellen Studie des St. Jude Children's Research Hospital wurden knapp 90% der *ETV6/RUNX1*-positiven Patienten aufgrund guter Stratifizierungskriterien der niedrigen Risikogruppe zugeordnet und erhielten eine weniger intensive Therapie. Ursache dafür war beispielsweise, dass Patienten mit *ETV6/RUNX1*-Fusion besser auf eine Therapie ansprechen, was sich in signifikant niedrigeren MRD-Leveln ausdrückte.[161]

ETV6/RUNX1-positive Rezidive erfolgen meist spät, wobei sich auch dieses Patientenkollektiv durch ein gutes Ansprechen auf die Therapie, eine gute mittelfristige Prognose und eine lange Remissionsdauer auszeichnet.[162] Ein möglicher Pathomechanismus zur Entstehung von *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidiven ist, dass die meisten, aber nicht alle prä-leukämischen Zellen durch die Therapie

zerstört werden und es durch ein zweites, unabhängiges Transformationsereignis zu einer neuen *ETV6/RUNX1*-positiven Leukämie kommt.[163] Dieser Rezidivklon kann als kleinerer Subklon schon während der Ersterkrankung vorhanden sein und spricht langsamer auf die Therapie an als der Hauptklon, vermutlich da er bei der Diagnose noch keine vollständige maligne Transformation aufweist.[164] Dieser Mechanismus liegt wohl eher späten Rezidiven zugrunde, doch es gibt auch Patienten mit *ETV6/RUNX1*-positiver ALL, die früh, mitunter schon während der Therapie, ein Rezidiv entwickeln. Man kann also davon ausgehen, dass *ETV6/RUNX1*-positive ALL eine heterogene Gruppe von Leukämien sind.

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass die Translokation t(12;21) lange vor Ausbruch der Leukämie auftritt und weitere Ereignisse für eine vollständige maligne Transformation notwendig sind.[165] Genetische Veränderungen, die mit der Translokation t(12;21) assoziiert sind, sind die Deletion des zweiten *ETV6*-Allels, Trisomie 21 und Duplikation des derivativen Chromosoms der(21)t(12;21) mit dem Fusionsgen.[166] Monoallelische Deletion von *PAX5* wurden in 28% der BVZ-ALL mit *ETV6/RUNX1*-Translokation nachgewiesen.[41] Die SNP-Array-Analyse pädiatrischer ALL-Proben ergab, dass *ETV6/RUNX1*-positive ALL durchschnittlich sechs Veränderungen der Kopienzahl aufweisen (häufiger Deletionen als Amplifikationen).[41]

1.7. Fragestellung und Zielsetzung

Die Translokation t(12;21) ist die häufigste chromosomale Aberration bei Leukämie im Kindesalter. Das aus der Translokation resultierende Fusionsgen besteht aus Anteilen der zwei Transkriptionsfaktoren *ETV6* und *RUNX1*, die beide wichtige Funktionen bei der Hämatopoese ausüben. Im Gegensatz zu *RUNX1* fungiert das chimäre Onkoprotein *ETV6/RUNX1* als konstitutiver Repressor der Transkription und hat dominant interferierende Effekte sowohl auf das *RUNX1*- als auch auf das *ETV6*-Protein. Man nimmt deshalb an, dass *ETV6/RUNX1* über eine Veränderung des Transkriptom der Zelle direkt zu deren Transformation und zur Leukämogenese beiträgt. Bisher bekannte Zielgene von *ETV6/RUNX1* sind häufig hämatopoesespezifisch und werden normalerweise durch *RUNX1* reguliert. Es ist jedoch unbekannt, welche weiteren Gene durch *ETV6/RUNX1* fehlreguliert werden und welche funktionellen Konsequenzen daraus resultieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb, durch genomweite Expressionsanalysen diejenigen Gene zu identifizieren, die von ETV6/RUNX1 beeinflusst werden. Dies könnte es ermöglichen, dysregulierte Proteine oder Signalwege aufzudecken, die zum leukämischen Zustand beitragen und die als Zielstrukturen für die Therapie t(12;21)-positiver Leukämien genutzt werden können.

Um die Genexpression in An- und Abwesenheit von ETV6/RUNX1 erfassen zu können, soll ein stabiles zelluläres Modell mit konditioneller ETV6/RUNX1-Expression etabliert werden. Ziel ist es, mittels onkoretroviralem Gentransfer das Transgen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors stabil in hämatopoetische Vorläuferzelllinien einzubringen.

Anhand dieses Modells soll die Auswirkung der *ETV6/RUNX1*-Expression auf zellbiologischer Ebene sowie auf Genexpressionsebene untersucht werden.

Als zellbiologische Parameter werden die Proliferation, die Apoptose und der Zellzyklus untersucht.

Die infolge der *ETV6/RUNX1*-Expression differenziell exprimierten Gene werden mittels Microarray-Technologie ermittelt. Die detaillierte bioinformatische Auswertung der generierten Daten soll Aufschluss darüber geben, ob Genprodukte mit ähnlicher Funktion oder bestimmte Signalwege regulatorisch betroffen sind und welche differenziell exprimierten Gene möglicherweise direkt von ETV6/RUNX1 reguliert werden.

Ob die Dysregulation eines Gens eine funktionelle Konsequenz für die Zelle hat und wie diese aussieht, sollen funktionelle Analysen klären, die auf das spezifische, zu untersuchende Gen abzustimmen sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten DNA-Größen- und Mengenstandards 100 bp-, 1 kb- und 1 kb-Plus-Marker stammten von Invitrogen. Die 1636 bp-Bande des 1 kb-DNA-Markers enthält 10% der auf dem Gel aufgetragenen DNA-Masse und die 1650 bp-Bande des 1 kb Plus-DNA-Markers etwa 8% der aufgetragenen Masse.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurden Rainbow-Marker (Amersham) und Magic XP-Marker (Invitrogen) verwendet.

Oligonukleotide wurden von der Firma TibMolBio bezogen. Von den GSF-gereinigten lyophilisierten Primern wurden 100 µM Stocklösungen angesetzt und bei -20°C gelagert. Für PCR, RT und Sequenzierreaktionen wurden 10 µM Arbeitslösungen hergestellt. Die verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind im Anhang (7.2) aufgelistet.

Antibiotika, Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur wurden von den Firmen Biochrom oder Invitrogen bezogen. Doxzyklin wurde bei Clontech gekauft.

Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs, Polyacrylamid und Bisacrylamid von BioRad.

Alle sonstigen Chemikalien wurden (sofern nicht anderweitig gekennzeichnet) von den Firmen Merck, Serva oder Sigma bezogen. Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff für die Zellkultur stammten von Becton Dickinson.

2.1.2. Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstämme

Bezeichnung	Genetische Marker	Herkunft
Fusion Blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_{K12^-} , m_{K12^+}), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac F</i> [<i>proA+B+</i> , <i>lac^fZΔM15::Tn10(tet^R)</i>]	Clontech
DH5α	F- $\phi 80$ / <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen

Zelllinien

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
BaF3	Interleukin-3 abhängige murine pro-B-Zelllinie	DSMZ
TMM	humane B-lymphoblastische Zelllinie, EBV transformiert	DSMZ
RO	humane B-lymphoblastoide Zelllinie, EBV-transformiert	DSMZ
REH	humane B-Vorläuferzelllinie	DSMZ
HEK	“ <i>Human Embryonic Kidney</i> “-Zellen, Adenovirus Typ 5 transformiert	DSZM
PT67	NIH/3T3-basierte Verpackungszelllinie, die das virale Hüllprotein 10A1 exprimiert	Clontech
GP2-293	HEK 293-basierte Verpackungszelllinie zur Verwendung mit dem VSV-G-Hüllprotein	Dr. R. Mrowka, Charité, Berlin

2.1.3. Medien und Agarplatten für E. coli

LB (Luria-Bertani)-Medium:

1% Baktotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,0

LB-Agarplatten: 15 g/l LB-Agar

LB-Agarplatten mit Saccharose: wie LB-Agarplatten und zusätzlich 7% Saccharose.

Alle Flüssigkeiten wurden für 20 Min. bei 120°C autoklaviert. Agar enthaltendes Medium wurde nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Je nach Bedarf wurden zum autoklavierten Medium Antibiotika hinzugegeben, um ein Selektivmedium zu erhalten.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Zur Farbidentifizierung von Fusion-Blue- bzw. DH5 α -Bakterienkolonien mit rekombinanter pDNR-Dual-Plasmid-DNA wurden auf LB-Agarplatten 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 µM) ausgestrichen.

2.1.4. Plasmidvektoren

Plasmid	Funktionelle Bereiche	Verwendung	Herkunft
TEL-CMV5	CMV, ETV6, Amp	cDNA von <i>ETV6</i>	Dr. S. W. Hiebert, USA
AML1- CMV5	CMV, RUNX1, Amp	cDNA von <i>RUNX1</i>	Dr. S. W. Hiebert, USA
TEL/AML1- CMV5	CMV, ETV6/RUNX1, Amp	cDNA von <i>ETV6/RUNX1</i>	Dr. S. W. Hiebert, USA
pDNR-Dual	Amp, Cm-ORF, SacB	Donorvektor des Creator-Klonierungssystems	Clontech, USA
pRevTet-On	CMV, rtTA, Neo, LTR, ψ , Amp	regulatorisches Plasmid des RevTet-On-Systems	Clontech, USA
pLP-RevTRE	minCMV, rtTA, Hygro, LTR, ψ , loxP, prok. Promotor, Kan,	experimentelles Plasmid des RevTet-On-Systems und Akzeptorvektor des Creator-Klonierungssystems	Clontech, USA
pLEGFP-C1	CMV, EGFP, Neo, LTR, ψ , Amp	viraler GFP-Vektor	Clontech, USA
pVSV-G	CMV, VSV-G, Amp	Hüllprotein	Dr. R. Mrowka, Charité, Berlin

Plasmide, die aus Zwischenklonierungen stammen, basieren auf dem pDNR-Dual-Vektor und sind aus Platzgründen hier nicht mit aufgelistet.

Die viralen Plasmide basieren alle auf dem MoMLV-Virus.

2.1.5. Antikörper und Antiseren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>Western Blot</i>		
N-Tel	polyklonales Antiserum gegen ETV6, aus Kaninchen	Dr. O. A. Bernard, INSERM, Paris
AML1-RHD	polyklonales Antiserum gegen RUNX1, aus Maus, bindet humanes und murines RUNX1, RHD(55-177)	Calbiochem, Merck, Deutschland
α -rabbit-HRP	polyklonales Antiserum gegen IgG aus Kaninchen, HRP-markiert	GE Healthcare
α -mouse-HRP	polyklonales Antiserum gegen IgG aus Maus, HRP-markiert	Amersham / jetzt GE Healthcare
<i>FACS-Analyse</i>		
Annexin V-FITC	Antikörper gegen Phosphatidylserin, FITC-markiert	IQ Products
α -CXCR2-PE	monoklonaler Antikörper gegen murinen CXCR2, Phycoerythrin-markiert, aus Ratte	R & D
Rat IgG2a Isotype Control-PE	monoklonaler Antikörper gegen ein künstliches Peptid, das natürlicherweise nicht vorkommt, aus Ratte, IgG2a-Isotypenkontrolle	R & D

2.2. Molekularbiologische Techniken

2.2.1. Anzucht von *E. coli* Bakterienkulturen

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C und 220 rpm in einem Warmluftschüttler (Certomat, B. Braun) inkubiert. Zur Selektion von Plasmiden wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (2.1.3) versetzt.

Für das PCR-Screening von Bakterienkolonien bei Klonierungen wurden die Kolonien in 20 μ l LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und für 2 h bei 37°C und 220 rpm im Warmluftschüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde direkt in der PCR eingesetzt.

2.2.2. Methoden zur Isolierung von DNA

2.2.2.1. Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab erfolgte mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen). Bis zu 20 µg Plasmid-DNA können aus 1,5 – 3 ml Übernachtskultur mit der Miniprep isoliert werden. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Isolierte Plasmide wurden durch Restriktion (2.2.10) überprüft.

2.2.2.2. Plasmidisolierung mit dem JetStar Kit von Genomed

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem JetStar-Kit (Genomed GmbH) isoliert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus 25 ml (Midiprep) bzw. 100 ml (Maxiprep) Übernachtskultur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der Kultur 45 – 100 µg bzw. 300 – 500 µg Plasmid-DNA. Isolierte Plasmide wurden durch Restriktion (2.2.10) überprüft.

2.2.2.3. Isolierung genomischer DNA mit dem Generation Capture Column Kit von Qiagen

Das Kit wurde zur Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen verwendet. Bis zu 10^7 Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4°C, 500 g), in 200 µl PBS resuspendiert, und die DNA wurde anschließend nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3. Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten. In mehreren Zyklen wurde die DNA denaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden (Primern) hybridisiert und diese wurde mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-abhängigen Polymerase verlängert. Vor dem ersten Zyklus wurde Plasmid-DNA 2 min (gDNA: 10 min) bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde 30 s denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang (7.2) zusammengestellt. Die Polymerisation der DNA erfolgte bei 72°C. Die Dauer richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und betrug ca. 1 s / 10 b. Es wurden 25 – 40 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss an die Zyklen wurde für 10 min eine finale Elongation der Fragmente bei 72°C durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz (50 μ l) setzte sich jeweils wie folgt zusammen: 1 – 50 ng DNA, je 1 μ l spezifische Primer (10 μ M), 10 μ l 10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM $MgCl_2$), 5 μ l dNTPs (2mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und 1,25 U AmpliTaq-DNA-Polymerase (Applied Biosystems). Die PCR erfolgte auf dem Mastercycler (Eppendorf).

Für das PCR-Screening von Bakterienkulturen bei Klonierungen wurden 1 – 2 μ l Bakterienkultur (2.2.1) direkt in der PCR eingesetzt. Bei der Denaturierung lysieren die Zellen und die Plasmid-DNA wird freigesetzt.

2.2.4. Aufreinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente für die In-Fusion-PCR-Klonierung (2.2.7.1) wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. PCR-Fragmente, die in der Sequenzierreaktion (2.2.11) eingesetzt wurden, wurden mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery & Nagel) aufgereinigt. Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte jeweils nach den Angaben der Hersteller.

2.2.5. Real time quantitative PCR

Bei der real time quantitativen PCR werden spezifische Nukleinsäuren quantifiziert, indem die Zunahme eines auf der Synthese des PCR-Produkts basierenden Fluoreszenzsignals gemessen wird. Die zur Quantifizierung erforderlichen Messungen erfolgen in der exponentiellen Phase der Amplifikation, wenn ein Zyklus mit einer zweifachen Zunahme des PCR-Produkts korreliert. Die Auflösungsgrenze liegt bei der real time PCR bei einer zweifachen Veränderung. Als Detektionsmethode wurden in dieser Arbeit TaqMan-Sonden (Hydrolyseproben) verwendet. TaqMan-Sonden binden sequenzspezifisch und basieren auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Bei Verwendung einer Standardreihe wird die Steigung der linearen Regressionkurve ermittelt. Sie ist ein Maß für die Effizienz der PCR: $-3,3 \pm 1$ kennzeichnet eine PCR-Effizienz von 100%. Handelt es sich bei den unbekanntenen Proben um RNA, sollte als Standard eine RNA verwendet werden, die im gleichen Ansatz in cDNA umgeschrieben wurde (RT). Plasmid-Standards sind für die Messung eines endogenen Gewebe-Transkripts nicht empfehlenswert.

Die Transkripte wurden in der Arbeit relativ quantifiziert. Die relative Quantifizierung misst den Unterschied in der Kopienzahl zwischen zwei Proben, die beide auf eine endogene Referenz normalisiert wurden oder zwischen zwei Transkripten, die in

derselben Probe gemessen wurden. Wenn die PCRs für verschiedene Gene unterschiedliche Effizienzen aufweisen, müssen diese bei der Quantifizierung berücksichtigt werden.

Für die Amplifizierung wurde Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Die Amplifizierung erfolgte auf dem iCycler IQ (Bio-Rad) mit folgendem Programm: initiale Denaturierung: 10 min bei 95°C; Hybridisierung: 15 s; Polymerisation: 15 s bei 72°C; Denaturierung: 10 s bei 95°C; 45 Zyklen. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaars: selbst designte *ETV6/RUNX1*- und *GusB*-spezifische PCR: 64°C; fertige TaqMan Assays für spezifische Gene: 60°C.

Relative Quantifizierung der ETV6/RUNX1-Expression in BaF3-Klonen

Für die Amplifizierung eines *ETV6/RUNX1*-spezifischen Produkts wurde das Primerpaar TEL-S / AEX3 und die TaqMan-Sonde TM TEL/AML1 verwendet (Tab. 7.3). Für die Normalisierung wurde parallel eine PCR mit Primern und einer TaqMan-Sonde für das murine *GusB*-Gen (Tab. 7.3) durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde in der *ETV6/RUNX1*-spezifischen PCR eine REH-Standardreihe und in der *GusB*-spezifischen PCR eine BaF3-Standardreihe (jeweils 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) mitgeführt. Ein PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 20 μ l enthielt jeweils 1 μ l cDNA, 5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1x PCR-Puffer, Primer (je 250 nM), 100 nm TaqMan-Sonde und 1 U Platinum Taq-Polymerase. Für die relative Quantifizierung wurde die Standardkurven-Kalkulationsmethode angewendet. Dabei wurden zunächst die Expressionswerte für *ETV6/RUNX1* und *GusB* anhand der Standardkurven bestimmt (REH und BaF3 unverdünnt = 1). Anschließend wurde die *ETV6/RUNX1*-Expression normalisiert.

Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten mit TaqMan Gene Expression Assays

Die Zellen wurden ausgesät, 48 h mit Doxycyclin stimuliert, und die RNA wurde anschließend mit dem mirVana Kit isoliert (2.2.12.2). mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.2.13). Für die Validierung der Microarray-Daten wurde jeweils in drei unabhängigen Experimenten cDNA erzeugt. 1 μ l cDNA wurde in der real time PCR eingesetzt. Für die real time PCR wurden cDNA-spezifische TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) verwendet. Die Assays enthalten Primer

und TaqMan-Sonden und sind standardisiert, sodass für alle die gleiche Hybridisierungstemperatur verwendet wird. Die Normalisierung erfolgte anhand des murinen β -Aktin-Gens (Mouse ACTB Endogenous Control Assay, Applied Biosystems), BaF3-Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Ein PCR-Ansatz bestand jeweils aus 1 μ l TaqMan Assay, 10 μ l Assay-Puffer, 1 μ l cDNA und H₂O in einem Endvolumen von 20 μ l. Die Auswertung erfolgte mit der Software Gene Expression Analysis for iCycler IQ Real-Time PCR Detection System (Version 1.10, Bio-Rad), die mit einem speziellen Algorithmus [167] arbeitet. Dieser errechnete aus den Ct-Werten unter Berücksichtigung der PCR-Effizienzen relative Quantitäten, die auf die Kontrolle bezogen und anschließend auf β -Aktin normalisiert wurden. Die PCR-Effizienzen wurden anhand mitgeführter Standardreihen bestimmt. Für die Standardreihe wurde cDNA von BaF3-#6 in H₂O verdünnt (1, 2x 10⁻¹, 4x 10⁻², 8x 10⁻³, 1,6x 10⁻³).

2.2.6. Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden für analytische Zwecke nach der Größe durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen (1x TAE: 40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5; Agarose, 1 μ g/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt (EasyPhor, Biozym). Die Agarosekonzentration variierte in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente zwischen 0,8 und 2% (w/v). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Volumen Probenpuffer (50% Glycerin, 10x TAE, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte mit 1x TAE (s.o.) als Elektrophoresepuffer bei Spannungen zwischen 80 und 130 V. Das Gel wurde anschließend unter dem Transilluminator ausgewertet.

2.2.7. Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.7.1. In-Fusion-PCR-Klonierung

Bei der In-Fusion-PCR-Klonierung (Clontech) werden PCR-Fragmente über eine Enzym-vermittelte Reaktion in einen linearisierten Vektor eingebracht. Dazu werden bei der Amplifikation (2.2.3) mit Hilfe der Primer 5' und 3' vom Fragment Sequenzen eingebracht, die homolog zum Vektor sind. Das In-Fusion-Enzym bindet die homologen DNA-Enden und vermittelt die „Rekombination“. Diese erfolgt gerichtet,

was die Ausbeute von Klonen mit korrekter Orientierung des Fragments gegenüber der herkömmlichen PCR-Klonierung erhöht.

Zielgen wird in PCR mit Primern amplifiziert, die 15 b-Überhänge homolog zu den Vektorenden enthalten

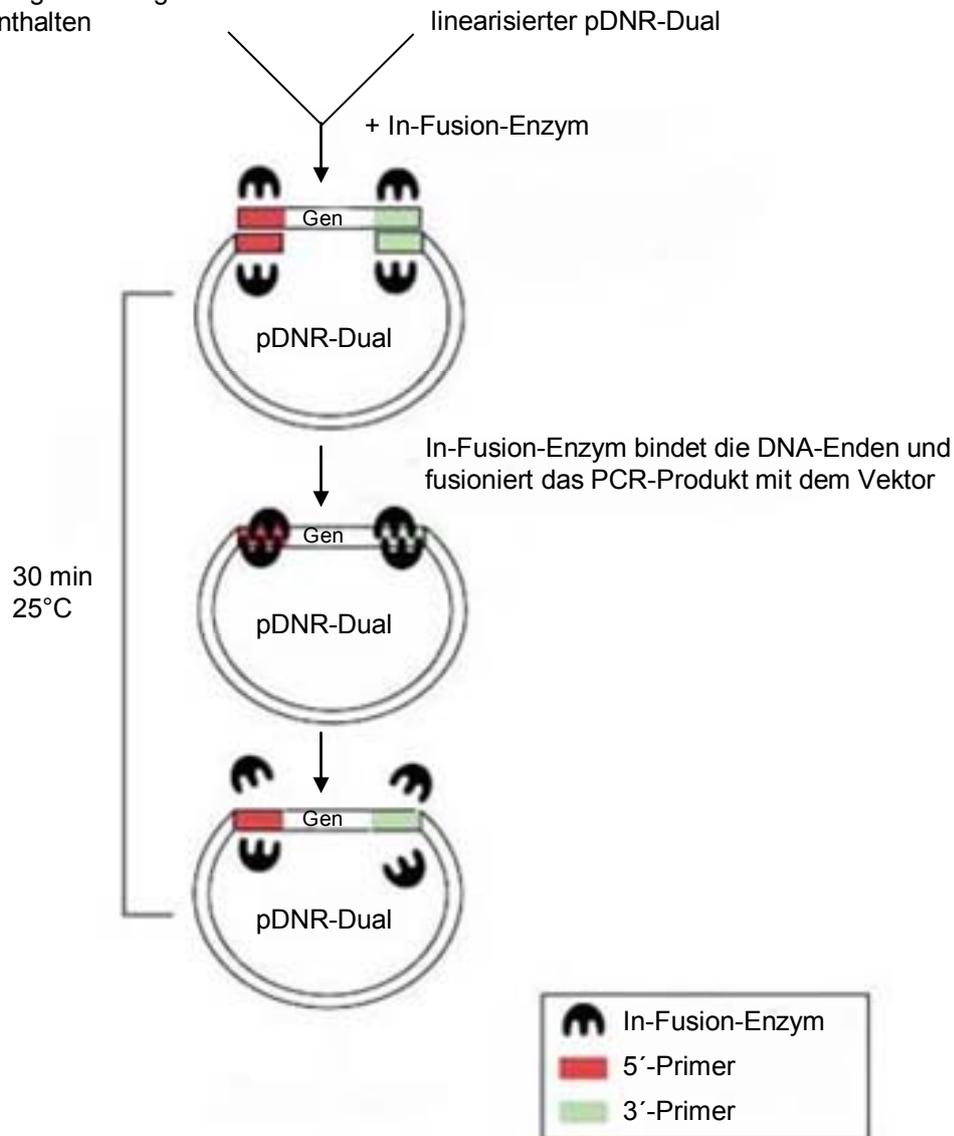


Abb. 2.1: In-Fusion-PCR-Klonierung

Die zu klonierende Sequenz wird mit bestimmten Primern amplifiziert und in einer Enzym-vermittelten Reaktion ohne Restriktion und Ligation in den Donorvektor eingefügt.

Nach Angaben des Herstellers wurden Primer designet, durch welche die cDNA-Sequenz von *ETV6/RUNX1*, *RUNX1* bzw. *ETV6* vom ATG bis zum TGA amplifiziert wurde (Tab. 7.2), wodurch die Expression gesteigert wird.

Für die PCR wurden 2,5 U Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, da diese eine „proofreading“-Aktivität besitzt und sechsmal weniger falsche Nukleotide einbaut als Taq-Polymerase. Die aufgereinigten PCR-Produkte (2.2.4) wurden im Agarosegel kontrolliert, und anhand des 1kb-Plus-Markers wurde die DNA-

Konzentration bestimmt (2.2.14.1). Die generierten PCR-Fragmente wurden in den im Kit enthaltenen linearisierten Vektor pDNR-Dual (2.2.7.2) kloniert. Die cDNAs wurden im Leserahmen mit der ersten loxP-Stelle des Donorvektors pDNR-Dual kloniert. Die kodierende Sequenz ist somit automatisch im Leserahmen mit allen 5'-Peptiden in den Akzeptorvektoren, was von Bedeutung ist, falls Fusionsproteine exprimiert werden (2.2.7.2).

Das Volumen eines Klonierungsansatzes betrug jeweils 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 50 ng PCR-Produkt, 100 ng linearisierter Vektor, 2 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µg BSA und 20 U In-Fusion-Enzym. Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt, um die Reaktion zu unterbrechen. 1 µl des Reaktionsansatzes wurde in der Transformation in DH5α oder Fusion Blue kompetente Zellen (2.2.9) eingesetzt. Nicht linearisierte Vektoren wurden durch blau-/ weiß-Selektion auf Agarplatten mit X-Gal und IPTG (2.1.3) identifiziert und weiße Kolonien mittels PCR-Screening (2.2.3) analysiert. Dabei wurde jeweils ein Primer, der in der Vektorsequenz bindet, mit einem Primer, der im Insert bindet, kombiniert (Tab. 7.3, Versuch 1). Die Basenabfolge von 3 – 4 positiven Klonen pro Klonierung wurde durch Sequenzierung (2.2.11 und Tab. 7.3, Versuch 2) verifiziert, und Klone ohne Amplifizierungsfehler wurden als Glycerolstock bei -80°C gelagert.

2.2.7.2. Creator-Rekombination

Die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination ist die Grundlage des Creator-Klonierungssystems von Clontech. Dabei werden DNA-Abschnitte von einem Donorvektor auf einen Akzeptorvektor übertragen. Cre, die Rekombinase des Bakteriophagen P1, vermittelt die Rekombination zwischen bestimmten DNA-Sequenzen, den loxP-Stellen, die im Donor- und Akzeptorvektor des Creator-Systems vorhanden sind. Auf diese Weise wird das Transgen in den Zielvektor eingebracht. Das Creator-System bietet den Vorteil, dass das einmal in einen Donorvektor eingebrachte Transgen durch Rekombination in eine Vielzahl für bestimmte Applikationen entwickelte Akzeptorvektoren überführt werden kann. Die Rekombination ist schnell, effizient und findet gerichtet statt.

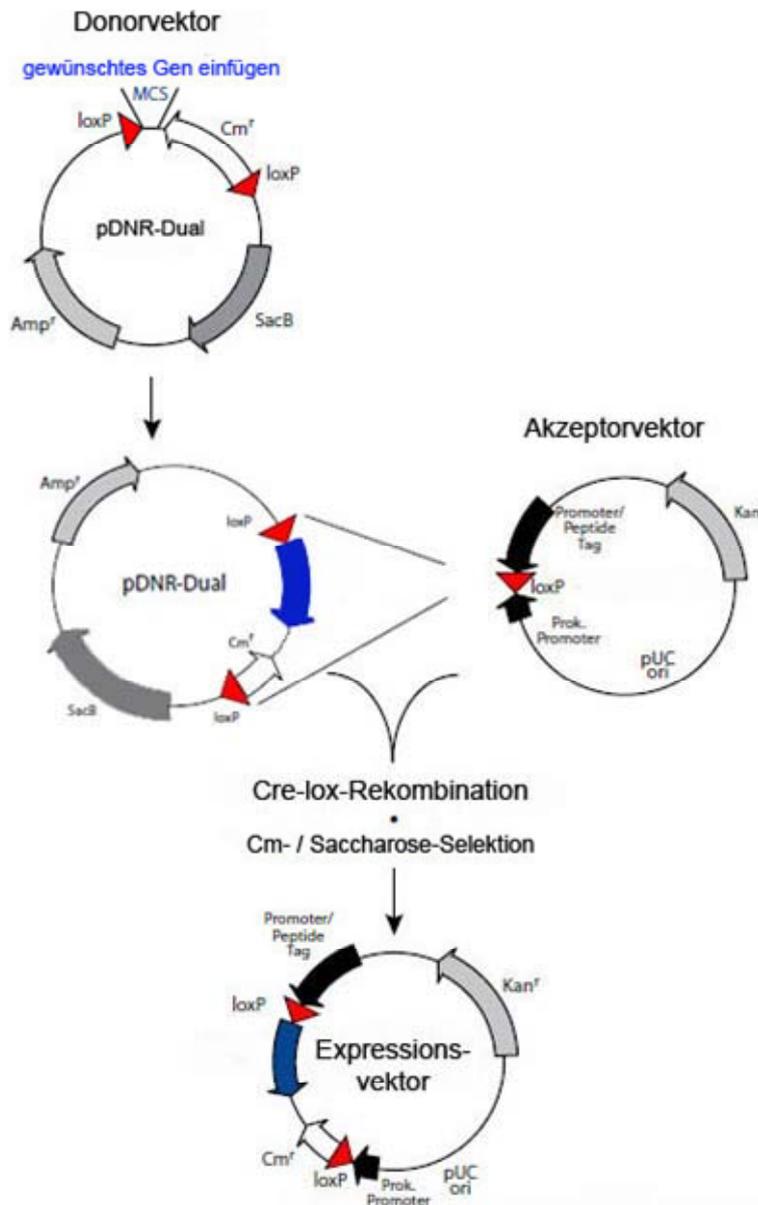


Abb. 2.2: Das Creator-Klonierungssystem

Das Creator-System von Clontech ermöglicht ein schnelles und einfaches Klonieren eines Inserts, sobald dieses in einem Donorvektor vorliegt. Mittels Cre-Rekombinase-vermittelter Rekombination kann das Insert in eine Vielzahl für bestimmte Applikationen entwickelte Akzeptorvektoren übertragen werden. Auch das RevTet-System ist Creator-kompatibel, in diesem Falle bildet das experimentelle Plasmid den Akzeptorvektor (2.2.8).

Für einen Rekombinationsansatz wurden jeweils 200 ng Donorvektor und 200 ng Akzeptorvektor, 2 µl 10x Cre-Reaktionspuffer, 2 µg BSA und 1 µl Cre-Rekombinase in einem Endvolumen von 20 µl vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 5 min. 1 µl der Reaktion wurde für die Transformation (2.2.9) eingesetzt. Positive Klone wurden auf Agarplatten mit Chloramphenicol und Saccharose (2.1.3) selektiert. Kolonien wurden mittels PCR-Screening (2.2.3) mit dem loxP-überspannenden Primerpaar PCP-1 / PCP-2 (Tab.

7.3) analysiert. Ausgewählte Klone wurden durch Restriktion (2.2.10) geprüft und als Glycerolstock bei -80°C gelagert.

2.2.8. Das Creator-kompatible onkoretrovirale Vektorsystem RevTet-ON

Das Tet-System basiert auf zwei Elementen des Tetrazyklinoperons und resultiert in transgenen Zelllinien, in denen sich das gewünschte Insert unter der Kontrolle eines Doxyzyklin-induzierbaren Promotors befindet. Beim Tet-ON-System bewirkt die Zugabe von Doxyzyklin eine Induktion der Promotoraktivität. Das RevTet-ON-System von Clontech besteht aus zwei onkoretroviralen Vektoren, die die Elemente des Tet-ON-Systems tragen. Vom regulatorischen Plasmid pRevTet-ON erfolgt die konstitutive Expression des reversen Tet-Repressors (rTetR), der mit einer Transaktivierungsdomäne (TA) fusioniert ist. Auf dem experimentellen Plasmid pRevTRE befindet sich das Transgen unter der Kontrolle des minimalen, induzierbaren Promotors.

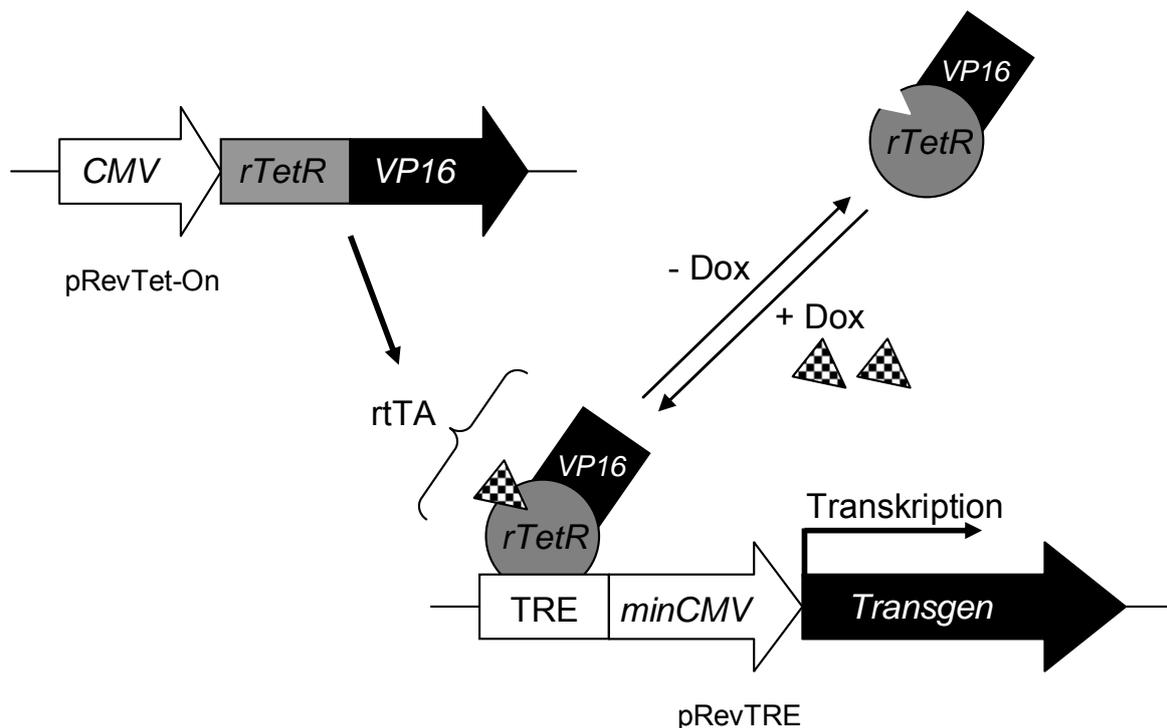


Abb. 2.3: Funktionsprinzip des RevTet-ON-Systems

Vom regulatorischen Plasmid (pRevTet-On) wird konstitutiv der reverse Transaktivator (rtTA) exprimiert. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus dem reversen Repressor des Tetracyclin-Operons (rTetR) und der Transaktivierungsdomäne von VP16. In Gegenwart von Doxyzyklin bindet rtTA auf dem experimentellen Plasmid (pRevTRE) an das tetracyclin-responsive-element (TRE), das direkt stromaufwärts des minimalen CMV-Promotors (nur TATA-Box) liegt, und induziert die Transkription des Transgens.

Beim Creator-kompatiblen RevTet-System enthält das experimentelle Plasmid eine loxP-Stelle und wird deswegen als pLP-RevTRE bezeichnet. Durch die Rekombination wird die zwischen den loxP-Stellen liegende Sequenz des Donorvektors in die loxP-Stelle des Akzeptorvektors pLP-RevTRE eingefügt (2.2.7.2). Dabei gerät das Transgen unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors.

2.2.9. Transformation

Transformation in DH5 α

100 μ l chemokompetente DH5 α (Invitrogen) wurden mit 1 – 10 ng Plasmid-DNA (2.2.2), 1 μ l In-Fusion-Klonierungsreaktion (2.2.7.1) oder 1 μ l Creator-Klonierungsreaktion (2.2.7.2) nach Herstellerangaben transformiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den Bakterienkolonien wurden anschließend Flüssigkulturen (2.2.1) angeimpft und Plasmid-DNA (2.2.2) isoliert, oder es wurde ein PCR-Screening durchgeführt (2.2.3).

Transformation in Fusion Blue

50 μ l chemokompetente Fusion Blue (Clontech) wurden mit Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers transformiert, und der Ansatz wurde wie bei DH5 α weiter verwendet.

2.2.10. Spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt. Ein Restriktionsansatz enthielt 1 μ g DNA, 2 μ l des entsprechenden 10x Inkubationspuffers und 5 U Restriktionsendonuklease. Nach 1 – 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l Probenpuffer abgebrochen und die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.6).

2.2.11. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxymethode nach Sanger.[168]

2.2.11.1. Sequenzierreaktion

Für die zyklische Sequenzierreaktion wurden 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt (2.2.4) oder 750 ng Plasmid-DNA mit 0,75 μ l Primer (10 μ M) und 2 μ l Big Dye (Big

Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) in einem Endvolumen von 10 µl gemischt. Die Sequenzierung erfolgte im Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf) mit folgendem Programm: Denaturierung: 96°C, 1 min; Hybridisierung: 52°C, 10 s; DNA-Synthese: 60°C, 4 min; 25 Zyklen.

2.2.11.2. Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Nicht-inkorporierte gelabelte Dideoxy-Nukleotide wurden mit dem DyeEx Spin Kit (Qiagen) aus der Sequenzierreaktion entfernt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.11.3. Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

4 µl der aufgereinigten Sequenzierreaktion wurden mit 16 µl H₂O (HPLC geeignet) gemischt. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit Hilfe des automatischen Sequenzierers ABI PRISM Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems).

2.2.12. Präparation von RNA

2.2.12.1. Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Zur Reduktion der Viskosität wurde das Zelllysate mit einem Qias shredder (Qiagen) homogenisiert. Ein DNase-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) wurde während der RNA-Präparation auf der Säule durchgeführt. Die Präparation der Gesamt-RNA und der DNase-Verdau erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Mit dem Mini Kit können bis zu 100 µg Gesamt-RNA aus maximal 10⁷ Zellen isoliert werden. 2 µl RNA wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.6), um die Integrität der RNA zu überprüfen. Die Konzentration wurde photometrisch (2.2.14.1) bestimmt.

2.2.12.2. Präparation Gesamt- und micro RNA

Mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) ist es möglich, Gesamt-RNA inklusive kleiner RNA-Spezies wie z.B. miRNA oder siRNA zu isolieren. Gesamt-RNA wurde aus 10² – 10⁷ Zellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser aus dem Filter eluiert. Die Integrität und die Konzentration der RNA wurden wie unter 2.2.12.1 beschrieben ermittelt.

2.2.13. cDNA-Erststrangsynthese durch Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription (RT) wird mit Hilfe von Primern und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (meist Reverse Transkriptase) aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die cDNA-Synthese in dieser Arbeit erfolgte mit Random Hexamer Primern (sechs zufällige Nukleotide). 1 µg RNA (2.2.12) wurde mit RNase-freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Zum Aufschmelzen der Sekundärstruktur wurde die RNA 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt, wodurch die Renaturierung der RNA-Stränge verhindert wurde. Für die Erststrangsynthese wurden 4 µl 5x RT-Puffer (Invitrogen), 1 µl 20 mM dNTPs, 2 µl 10x Random Hexamer Primer (Roche), 2 µl 100 µM DTT, 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, 200 U/µl) hinzugegeben. Die Primer wurden 10 min bei 25°C hybridisiert und die DNA wurde 45 min bei 42°C polymerisiert. Anschließend wurde das Enzym für 3 min bei 99°C inaktiviert. Die DNA-RNA-Hybride wurden zur Amplifizierung der cDNA in der PCR (2.2.3) oder real time PCR (2.2.4) eingesetzt.

2.2.14. Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen

2.2.14.1. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde entweder photometrisch mit dem Biophotometer (Eppendorf) oder mit Hilfe der Ethidiumbromid-Konzentration bestimmt.

Die photometrische Quantifizierung erfolgte in H₂O. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀, der die Reinheit der Nukleinsäure angibt, wurde stattdessen in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) bestimmt. Darin hat reine RNA eine Ratio von 1,9 – 2,1 und reine DNA eine Ratio von 1,8 – 2,0.

Über die Ethidiumbromid-Konzentration wurde die Nukleinsäurekonzentration bestimmt, indem die DNA zunächst in einem Agarosegel (2.2.6) elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Im Anschluss wurde die Konzentration in einem Transilluminator durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetrennten DNA-Marker (2.1.1) anhand der Bandenintensität abgeschätzt.

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Das Gerät misst sehr kleine Probenvolumina (1 µl) und innerhalb eines großen Konzentrationsbereichs (2 ng /µl – 15 µg/µl).

2.2.14.2. Quantifizierung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mit der Methode nach Bradford oder mit BCA bestimmt.

Bradford-Assay

Für die Messung wurden 250 µl Proteinassayreagenz (BioRad) mit 2 µl Standard oder Probe in einer 96 well-Platte gemischt und die Absorption im Spektrophotometer (Ascent, Thermo Fisher Scientific) bei 590 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt, die zuvor aus den Extinktionswerten eines BSA-Standards (0,313, 0,625, 1,25, 2,5 mg/ml) erstellt worden war und zwar nach der Formel: $m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$.

Verschiedenen Reagenzien interferieren mit dem Bradford-Assay u.a. SDS, dessen Konzentration in der Proteinprobe max. 0,1% betragen darf und Harnstoff, dessen Konzentration max. 6 M sein darf.

BCA-Assay

Für die Messung wurde der BCA-Assay Kit von Pierce (Pierce, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Reagenzien A und B wurden 50:1 gemischt. Jeweils 200 µl dieser Mischung wurden mit 10 µl Standard oder Probe 30 min bei 37°C inkubiert. Von jedem Ansatz wurde die Absorption im Spektrophotometer bei 570 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt, die zuvor aus den Extinktionswerten eines BSA-Standards (0,025, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 mg/ml) erstellt worden war.

2.2.15. Isolierung von Proteinen

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde zum Aufschluss der Membranen Extraktionspuffer mit Detergenzien verwendet. Die Homogenisierung des Lysats erfolgte wahlweise durch Vortexen, mehrmaliges Auftauen und Einfrieren und / oder Ultraschallbehandlung. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, Zentrifugationsschritte erfolgten in gekühlten Zentrifugen.

Extraktion von Proteinen mit NP-40-Puffer

NP40-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 25 mM Tris/HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Sigma), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Pefabloc

SC (Biomol, 100 mM), Proteaseinhibitor-Cocktail. Na_3VO_4 und der Proteaseinhibitor-Cocktail wurden dem Puffer erst vor dem Gebrauch zugesetzt. Für den Proteaseinhibitor-Cocktail wurde eine Complete Mini-Tablette (Roche) in 10 ml H_2O gelöst und 0,2 Volumen dieser Lösung für den Proteinextraktionspuffer verwendet.

Für die Proteinextraktion wurden 10^7 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 100 μl NP-40-Puffer resuspendiert. Für die Lyse wurden die Zellen 30 s gevortext und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Membrantrümmer und genomische DNA zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und aliquotiert. 5 μl wurden für die Messung der Proteinkonzentration (2.2.14.2) abgenommen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Extraktion von Proteinen mit SDN-Puffer

Die Extraktion der Proteine mit SDN-Puffer basiert auf der Methode von Poirel et al. (Poirel, 1998 [169]) und wurde leicht modifiziert. Der SDN-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.5% SDS, 0.5% NP-40, 10 mM Natriumfluorid, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM Pefabloc SC (Biomol, 100 mM), Proteaseinhibitor-Cocktail. Na_3VO_4 und der Proteaseinhibitor-Cocktail wurden dem Puffer erst vor dem Gebrauch zugesetzt. Der Proteaseinhibitor-Cocktail wurde wie im vorherigen Abschnitt beschrieben zubereitet und eingesetzt.

Für die Proteinextraktion wurden mindestens 5×10^7 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit 100 μl Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert, 30 s gevortext und 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat mit Ultraschall homogenisiert (Sonopuls, Bandelin; 10 Zyklen, mittlere Stärke). Membrantrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) entfernt und der Überstand aliquotiert und eingefroren (s. vorheriger Abschnitt).

Extraktion von Proteinen mit CHAPS-Puffer

Für 2D-Gelelektrophoresen wurden Proteine mit CHAPS-Puffer extrahiert. CHAPS gehört zu den zwitterionischen Detergenzien, die wie die ionischen Detergenzien denaturierend wirken, jedoch keine Nettoladung aufweisen, also keine elektrophoretische Mobilität besitzen und somit nicht mit der IEF interferieren.

Jeweils 4×10^7 Zellen wurden viermal mit kaltem PBS gewaschen (10 min, 1000x g), in PBS resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und zentrifugiert (10 min, 1000x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde sorgfältig entfernt. Das Gewicht des Pellets wurde durch Wiegen der Reaktionsgefäße mit und ohne Pellet bestimmt. Das Pellet wurde im vierfachen Volumen CHAPS-Puffer (0,14 mM CHAPS, 100 μ M PMSF, 1,4 μ M Pepstatin A, 16 mM KCl, 1,6% Glycerin, 8 mM NaH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , Proteaseinhibitor-Cocktail) resuspendiert. Für den Proteaseinhibitor-Cocktail wurde eine Complete Mini-Tablette (Roche) in 0,4 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4^- / \text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ -Puffer gelöst und 0,08 Volumen dieser Lösung für den CHAPS-Puffer verwendet. Für die Lyse wurden die Zellen dreimal eingefroren und aufgetaut, danach 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 6 Ultraschallzyklen behandelt (15 s Ultraschall, 30 s rühren, 1 min Inkubation auf Eis). Die DNA wurde 30 min bei 37°C mit der Endonuklease Benzonase (1,5 U/ μ l) verdaut. Aus diesem Lysat erfolgte die Proteinbestimmung mittels des BCA-Kit von Pierce (2.2.14.2). Dem Lysat wurden noch Harnstoff und DTT hinzugefügt (Endkonzentration: 15 M Harnstoff, 4% DTT).

2.2.16. Nachweis von Proteinen im Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis bestimmter Proteine in Proteingemischen. Für die gelelektrophoretische Auftrennung und den Transfer der Proteine wurde das NuPAGE-System von Invitrogen verwendet. Das Gelsystem besteht aus fertigen Bis-Tris oder Tris-Acetat Gelen und speziellen Puffern. Beide Gele weisen einen niedrigeren pH-Wert auf als die Tris-Glycin-Gele der traditionellen SDS-PAGE (Lämmli, 1970). Dadurch verbessern sich die Haltbarkeit der Gele, die Auftrennung der Banden und die Stabilität der Proteine.

2.2.16.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Von NP40-Proteinextrakten wurden 30 μ g, von SDN-Extrakten 15 μ l eingesetzt. Die Proteinextrakte wurde mit Extraktionspuffer (2.2.15), 4x LDS-Puffer (Invitrogen) und 10x Reducing Agent (Invitrogen) gemischt. Das Endvolumen betrug 20 μ l. Die Proteine wurden 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. 2 μ l Rainbow-Marker bzw. 8 μ l Magic Marker XP (2.1.1) wurden direkt eingesetzt.

SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden NuPAGE Novex 7% Tris-Acetat-Gele (1 mm Geldicke) mit NuPAGE Tris-Acetat SDS-Laufpuffer verwendet, die Proteine im Bereich um 100 kDa am besten auftrennen. Die Puffer und Gele wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dem Laufpuffer wurde 1/400 Volumen NuPAGE Antioxidant zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 1 h 15 min in der XCell *Sure Lock* Mini-Cell (Invitrogen).

2.2.16.2. Proteintransfer auf PVDF-Membran

Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf PVDF-Membran erfolgt zwischen zwei Elektroden in der mit Puffer gefüllten Kammer (Tankblotten). Trenngel, PVDF-Membran (Invitrogen), Whatman-Filterpapiere (Invitrogen) und Schwämme wurden nach Hersteller-Angaben vorbereitet und aufeinander geschichtet. Das Sandwich wurde zwischen den Elektroden in der Transferkammer (XCell II Blot Module in der XCell *Sure Lock* Mini-Cell, Invitrogen) platziert und diese mit dem Transferpuffer (NuPAGE 20x Transferpuffer, NuPAGE Antioxidant und Methanol nach Angaben des Herstellers gemischt) aufgefüllt. Der Transfer erfolgte 1 h bei 35 V und RT und wurde anhand des gefärbten Rainbow-Markers überprüft.

2.2.16.3. Immunfärbung

In dieser Arbeit wurde das ETV6/RUNX1-Fusionsprotein mit Primärantikörpern gegen ETV6 und RUNX1 und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (2.1.5) detektiert.

Die folgende Tabelle enthält die Kurzbeschreibung der Methode:

anzusetzende Reagenzien

Blotto: 5% (w/v) Magermilchpulver und 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS

PBS-T: 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS

Substrat-Lösung für HRP-Reaktion:

Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer)
nach Angaben des Herstellers angesetzt

Durchführung

Blocken		1 h in Blotto
1. AK	N-TEL, 1:1000 bzw. AML1-RHD (100 µg/ml), 2,5 µg/ml	über Nacht in Blotto bei 4°C
Waschen		3x 10 min in Blotto
2. AK	α-rabbit-HRP, 1:5000 bzw. α-mouse-HRP, 1:2000	35 min in Blotto
Waschen		10 min in Blotto 2 x 10 min in PBS-T 10 min in PBS
HRP-Reaktion	4 ml Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus für eine Membran, 90 s im Dunkeln inkubiert; Biolumineszenz auf Film (Kodak Biomax MR1, Sigma) detektiert; Film entwickelt (Optimax, Protec)	

Die Detektion von ETV6/RUNX1 mit beiden Antikörpern auf einer Membran erfolgte nacheinander. Dazu wurden die Antikörper nach der ersten Immunfärbung durch 10 min Inkubation mit 1-molarer Glyzinlösung von der Membran entfernt und diese dann durch 10 min Waschen mit PBS-T neutralisiert. Anschließend erfolgte die Immunfärbung mit dem nächsten spezifischen Antikörper.

2.3. Zellkultur / Heterologe Expression

2.3.1. Kultivierung der Zellen

Suspensionszellen

Zelllinie	Zellkulturmedium	Aussaat	Passagieren
BaF3	90% RPMI, 10% FKS, 10 ng/ml murines IL-3	1 - 5x 10 ⁵ Z./ml	1:10 alle 3 d
TMM	90% IMDM, 10% FKS	2 - 8x 10 ⁵ Z./ml	1:2 alle 2 - 3 d
RO	80% RPMI, 20% FBS	1x 10 ⁶ Z./ml	1:2 alle 2 d
Reh	90% RPMI, 10% FBS	5 - 10x 10 ⁵ Z./ml	1:3 alle 2 - 3 d

Adhärente Zellen

Zelllinie	Zellkulturmedium	Aussaat	Passagieren
HEK-293	90% DMEM, 10% FKS	0,5 10^5 Z./ml	1:5 - 1:6 alle 2 - 3 d
PT67	90% DMEM, 10% FKS	1x 10^5 Z./ml	1:10 - 1:20 alle 2 - 3 d
GP2-293	90% DMEM, 10% FBS	1x 10^5 Z./ml	1:10 alle 2 - 3 d

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturmedium maximal über 15 Passagen (Suspensionszellen) bzw. 20 Passagen (adhärente Zellen) kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen in den oben angegebenen Verhältnissen passagiert. Die Verpackungszelllinien PT67 und GP2-293 (2.1.2) wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden adhärente Zellen 1x mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom) abgelöst, in Zellkulturmedium resuspendiert und ausgesät. Suspensionszellen wurden zentrifugiert (1000x g, 10 min), in Zellkulturmedium resuspendiert und ausgesät.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die resuspendierten Zellen mit Trypanblau gefärbt und im Lichtmikroskop gezählt oder im Casy-Zellzählgerät (Schärfe System GmbH, Reutlingen) analysiert.

Transgene Zellen

Für die Kultivierung stabiler transgener Zellen wurde dem Zellkulturmedium Antibiotikum zugesetzt. Das verwendete Antibiotikum richtete sich nach der von dem in die Zelle eingebrachten Plasmid vermittelten Resistenz. Es wurde die Hälfte der zur Selektion benötigten Konzentration (Tab. 2.1:) eingesetzt.

2.3.2. Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion wurde das liposomale Transfektionsmittel Metafectene (Biontex) verwendet. Der Transfektionsansatz wurde in serumfreiem Medium nach den Angaben des Herstellers zubereitet. DNA und Metafectene wurden im Verhältnis 1:5 verwendet. Der Ansatz wurde auf die am Tag zuvor ausgesäten Zellen gegeben und 3 – 6 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt.

	PT67	GP2-293
Format	10 cm-Schale	10 cm-Schale
Zellzahl	6x 10 ⁵ Zellen	7,8 x 10 ⁶
DNA	10 µg	26,8 µg (je 13,4 µg)
Metafectene	50 µl	134 µl
DMEM	1000 µl	1000 µl

Die GFP-Expression wurden nach 24 – 48 h untersucht. Die Selektion mit Antibiotikum wurde nach 48 h begonnen.

2.3.3. Selektion stabiler Zellen

Stabil transfizierte oder infizierte Zellen wurden über die durch den Vektor eingebrachte Antibiotikumsresistenz selektiert. Für die Selektion wurden die Zellen mit Antibiotikum im Zellkulturmedium 10 Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 2, 4 und 7 Tagen gewechselt. Ggf. wurden die vitalen Zellen während der Selektion mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (2.3.4) aufgereinigt, um den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Kultur zu mindern.

Für die verwendeten Zelllinien wurden in einem Vorversuch folgende Antibiotikumskonzentrationen titriert.

Tab. 2.1: Antibiotikakonzentrationen für die Selektion stabiler transgener Zellen nach Transfektion und Infektion

Zellen	G418	Hygromycin
PT67	400 µg/ml	200 µg/ml
BaF3	400 µg/ml	2000 µg/ml
TMM	800 µg/ml	1000 µg/ml
RO	600 µg/ml	1000 µg/ml

Die Auswertung erfolgte bei adhärennten Zelllinien im Lichtmikroskop über das Ablösen der Zellen und bei Suspensionszelllinien über Trypanblaufärbung eines entnommenen Aliquots.

2.3.4. Reinigung vitaler Zellen mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

2 ml Medium wurden mit 8 ml Ficoll (Biochrom) unterschichtet und 2 – 3 ml Zellsuspension vorsichtig auf das Medium gegeben. Die toten Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min, 800x g, ohne Bremse) von den vitalen Zelle getrennt. Anschließend wurde das Medium bis kurz über den Zellen an der Grenzschicht entfernt. Die Zellen wurden abgenommen, mit Medium gewaschen und in optimaler Zelldichte ausgesät.

2.3.5. Beschichtung von Zellkulturplatten mit Retronectin

Unbehandelte Zellkulturplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 2 µg/cm² Retronectin (MoBiTec) beschichtet und vor Einsaat der Zellen einmal mit PBS gewaschen.

2.3.6. Infektion von Zielzellen

Die Technologie des retroviralen Gentransfers basiert auf der Verwendung viraler Plasmide in Kombination mit Verpackungszellen, in denen die Produktion der Viren erfolgt. Dazu sind eine Reihe viraler Gene notwendig, die stabil ins Genom der Verpackungszelllinie integriert bzw. von den retroviralen Vektoren getragen werden. Das virale Gen *env* kodiert für das Hüllprotein, das den Tropismus des Virus bestimmt, also das Spektrum der Wirtszellen.

In dieser Arbeit wurden dualtrope bzw. pantrope Viren mit den Verpackungszelllinien PT67 und GP2-293 produziert, die unterschiedliche Hüllproteine verwenden und demnach verschiedene Infektionsmechanismen und Tropismen aufweisen:

Tab. 2.2: Charakteristika der Verpackungszelllinien, die für die Produktion der Retroviren verwendet wurden

Verpackungszelllinie	parentale Zelllinie	stabile Konstrukte	env	Infektionsmechanismus	Zielzellen	Tropismus
PT67	NIH-3T3	<i>gag+pol</i> , <i>env</i>	10A1	Rezeptor: RAM1 (Pit2) + GALVR (Pit1)	Säuger+Maus, Ratte	dualtrop
GP2-293	HEK293-T	<i>gag+pol</i>	wahlweise, diese Arbeit: VSV-G	Membranfusion	Säuger u. Nicht-Säuger	pantrop

2.3.6.1. Produktion und Aufreinigung der Viren

Viren wurden mit stabilen PT67-Verpackungszelllinien oder transient transfizierten GP2-293 produziert. Stabile virenproduzierende PT67-Verpackungszelllinien wurden durch Transfektion (2.3.2) mit den viralen Plasmiden pLEGFP-C1, pRevTet-On, pLP-RevTRE und pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1+K* und anschließender Selektion (2.3.3) hergestellt. GP2-293 wurden mit dem jeweiligen viralen Expressionsplasmid und pVSV-G ko-transfiziert (2.3.2). 24 – 48 h nach der Transfektion (GP2-293) bzw. nach Aussaat der stabilen Verpackungszelllinie (PT67) mit 80% Konfluenz wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Tote Zellen und Debris wurden durch Zentrifugation (1000 x g, 10 min) und anschließende Sterilfiltration durch eine PVDF-Membran (Millex HV, 0,45 µm Millipore) entfernt. Die Bestimmung des Titers von PT67 erfolgte wie vom Hersteller (Clontech) beschrieben durch Infektion von NIH-3T3-Zellen.

2.3.6.2. Infektion adhärenter Zellen

HEK-293-Zellen wurden am Tag vor der Infektion mit etwa 60% Konfluenz in 2 ml Zellkulturmedium in 6well-Platten ausgesät. Der Virensuspension (2.3.6.1) wurden 4 µg/ml Polybrene hinzugefügt. Für die Infektion wurde 1 ml Virensuspension zur 6-Well-Platte hinzugefügt. 24 h später wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurde die GFP-Expression im Durchflusszytometer untersucht.

2.3.6.3. Infektion von Suspensionszellen in Retronectin-beschichteten Zellkulturplatten

Am Tag vor der Infektion wurden 6-Well-Platten mit Retronectin beschichtet (2.3.5) und die Suspensionszellen passagiert. Für die Infektion wurden die Platten zunächst sukzessive mit Viren beladen. Dazu wurde 1 ml Virensuspension 30 min bei 37°C auf der Platte inkubiert und die Viren somit an das Retronectin gebunden. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Inkubation wurden 1 – 2x 10⁶ Zellen zu der Virensuspension in das Well gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen im Überstand mit dem Medium abgenommen, sowie die ans Retronectin gebundenen Zellen mit Medium abgespült und weiter verwendet.

Für die Infektion von BaF3-TetOn mit pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1* wurde die Methode folgendermaßen modifiziert: 24 h nachdem BaF3-TetOn in die mit Viren beladenen Wells ausgesät worden waren, wurden die Zellen, die sich im Überstand befanden, zum zweiten Mal auf diese Weise infiziert (Retronectin-Üb). Anschließend

wurden wiederum nur die Zellen im Überstand für die Selektion stabiler Zellen verwendet.

2.3.6.4. Ko-Kultur von PT67 und BaF3

PT67 Verpackungszellen wurden mit 80% Konfluenz in BaF3-Zellkulturmedium in 6well-Platten ausgesät. In die Wells wurden Einsätze mit einer porösen Membran gehängt. 10^6 BaF3-Zellen wurden auf der Membran ausgesät. Das Gesamtvolumen betrug 5 ml. Verpackungs- und Zielzellen wurden so 72 h ko-kultiviert. Nach 48 h wurde 1 ml verbrauchtes Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 72 h wurden die BaF3-Zellen von der Membran gespült, zentrifugiert ($1000\times g$, 10 min) und in frischem Medium die Selektion begonnen.

2.3.6.5. Infektion im 96-Well-Format

Für die Infektion in 96-Well-Platten wurde die aufgereinigte Virensuspension in Amicon Ultra-Zentrifugationsröhrchen (Millipore) mit einem MWCO von 100 kDa bei $4000\times g$ zentrifugiert. Adhärente Zellen wurden am Tag vor der Infektion ausgesät (HEK: $1,7\times 10^6$ Zellen in 100 μ l). Suspensionszellen wurden am Tag vor der Infektion passagiert und am Tag der Infektion ausgesät (BaF3, TMM: 1×10^6 Zellen in 100 μ l; RO: 2×10^6 Zellen in 100 μ l). 8 ml Virensuspension wurden auf 250 μ l reduziert (Konzentrationsfaktor: 32). Bis zu 50 μ l der konzentrierten Virensuspension wurden zu den Zellen gegeben, und das Kulturvolumen wurde mit Medium auf 200 μ l aufgefüllt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurde die Selektion begonnen oder die GFP-Expression im Durchflusszytometer untersucht.

2.3.7. Isolierung von Klonen durch limitierte Verdünnung der Zellen

Die Zellen wurden in serieller Verdünnung auf eine Dichte von 1,5 Zellen/ml eingestellt. 200 μ l dieser Zellsuspension (0,3 Z.) wurden pro Well einer 96 well-Platte ausgesät. Nach 10 Tagen wurden 100 μ l Medium aus den Wells entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Zur Expansion wurden die Klone in größere Zellkulturplatten überführt. Für die Isolierung von Klonen wurde das Zellkulturmedium mit folgenden Zusätzen modifiziert: 3 mM Natriumpyruvat (Invitrogen), 100 μ M α -Thioglycerol, 20 nM Bathocuproin-Disulfat, 25 mM HEPES.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Proliferations- und Zytotoxizitätsmessung mit dem MTS-Assay

Das lösliche Tetrazoliumsalz MTS (gelb) wird in Gegenwart von PMS zu Formazan (violet) reduziert. Die Reaktion wird in lebenden Zellen von der mitochondrialen Reduktase katalysiert, weshalb sie als Maß für die Vitalität der Zellen eingesetzt wird.

Proliferationsmessung

10^4 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Platte in 100 μ l Zellkulturmedium mit 1000 ng/ml Doxycyclin ausgesät. Für die Untersuchung der IL-3-Abhängigkeit wurden BaF3-Zellen in Medium ohne IL-3 ausgesät. Die Proliferationsmessung erfolgte nach 0, 24, 48 und 72 h. Dazu wurden 20 μ l MTS-Reagenz pro Well hinzugegeben und 1 h bzw. 4 h (Zellen ohne IL-3) inkubiert. Die Messung des Farbumschlags erfolgte im Spektrophotometer (Ascent, Thermo Fisher Scientific) bei 490 nm.

Von den Messwerten wurde der Leerwert (Medium + MTS) abgezogen. Pro Klon wurden drei Messwerte erhoben und gemittelt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte gemittelt.

Zytotoxizitätsmessung

3×10^4 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Platte in 100 μ l Zellkulturmedium mit 1000 ng/ml Doxycyclin, 5 μ g/ml Cyclohexamid und $\text{TNF}\alpha$ (0, 0,015, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 50 und 100 ng/ml) ausgesät und 8 h kultiviert. Anschließend wurden 20 μ l MTS / well hinzugegeben und 3 h inkubiert. Die Messung des Farbumschlags erfolgte im Spektrophotometer bei 490 nm.

Von den Messwerten wurde der Leerwert (Medium + MTS) abgezogen. Pro Klon und $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration wurden zwei Messwerte erhoben und gemittelt. Zur Darstellung der Inhibierung der Proliferation wurden die Messwerte der $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen auf den Messwert der nicht behandelten Zellen bezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte gemittelt.

2.4.2. Apoptose- und Nekrosedetektion mittels Annexin V-Markierung und Propidiumiodidfärbung

3x 10⁵ Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen zweimal mit kaltem Kalziumpuffer (13 g HEPES, 40,9 g NaCl, 1,4 g CaCl₂ in 250 ml H₂O gelöst) gewaschen (1000x g, 6 min, 4°C). Der Überstand wurde jeweils dekantiert, so dass 100 – 200 µl Puffer zurückblieben und das Pellet durch leichtes Klopfen gelockert. Die Zellen wurden mit 4 µl Annexin V-Antikörper 25 min auf Eis im Dunkeln markiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen. Es wurden 6 µl Propidiumiodid und 150 µl Kalziumpuffer hinzugegeben, die Zellen 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und dann im Durchflusszytometer analysiert.

2.4.3. Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Propidiumiodidfärbung

3x 10⁶ Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen (1000x g, 6 min, 4°C). Der Überstand wurde jeweils dekantiert, so dass 100 – 200 µl Puffer zurückblieben und das Pellet durch leichtes Klopfen gelockert. Dann wurde unter permanentem Vortexen 2 ml eiskalter 70% Ethanol zu den Zellen gegeben und diese 45 min bis über Nacht fixiert. Dabei wurde die Membran permeabel. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen (1200x g, 10 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet im restlichen Puffer gelockert. Durch Zugabe von 1 ml RNase A (0,5 mg/ml) und 30 min Inkubation bei 37°C wurde die RNA entfernt. 10⁶ Zellen dieser Suspension wurden mit kaltem PBS gewaschen (1000x g, 6 min, 4°C). Dann wurde 1 ml Propidiumiodid (0,1 mg/ml) hinzugegeben und die Proben 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde innerhalb von 3 h durchflusszytometrisch nachgewiesen. Ihre Intensität korreliert mit der DNA-Menge in der Zelle.

2.4.4. Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenproteinen

Für die durchflusszytometrische Analyse der Proteinexpression wurden die Zellantigene mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Um die unspezifische Bindung der zur Analyse verwendeten Antikörper an Fc γ -Rezeptoren bestimmen zu können, wurden Kontrollansätze mit einer Isotypenkontrolle markiert.

4 x 10⁵ Zellen wurden dreimal mit PBS + 0,5% (w/v) BSA gewaschen und anschließend in 100 µl dieses Puffers resuspendiert. Je 25 µl Zellsuspension wurden

in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 μg murinen IgG / 10^5 Zellen 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 10 μl PE-konjugiertem α -mouse-CXCR2 oder PE-konjugiertem IgG2a (beide aus Ratte) 30 – 45 min bei 2 – 8°C im Dunkeln gefärbt. Schließlich wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, in 400 μl Puffer resuspendiert und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FLH-2) analysiert.

2.4.5. Quantifizierung sekretierter Proteine mittels Sandwich-ELISA

Für die Quantifizierung von sekretiertem IL-6 wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 500 μl Zellkulturmedium mit 500 ng/ml Doxycyclin ausgesät. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen, Zellen und Debris wurde durch Zentrifugation (10 min, 1000x g) entfernt und der Überstand wurde bei -80°C bis zur Messung gelagert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Sandwich-ELISA (Murine IL-6 Elipair Kit, Abcam). Als Detektionsantikörper verwendet dieses Kit biotinylierten α -IL-6-AK, an den für die Farbreaktion Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden wird. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 100 μl Probe bzw. Standard eingesetzt. Für den quantitativen Nachweis wurde parallel eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen gemessen. Der lineare Messbereich lag zwischen 20 – 550 pg / ml.

2.5. Genexpressionsanalyse mit Oligonukleotidarrays

Für die Experimente wurde der GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array von Affymetrix verwendet. Auf diesem Oligonukleotid-Microarray befinden sich über 45000 Probe Sets, die mit mehr als 39000 Transkripten korrelieren, darunter 34000 charakterisierten murinen Genen. Ein Probe Set setzt sich aus 11 Oligonukleotiden (Probes) zusammen, die spezifisch für einen definierten Sequenzabschnitt eines Transkripts sind. Ein Transkript kann durch mehrere Probe Sets auf dem Chip vertreten sein.

2.5.1. cDNA-Synthese, Hybridisierung und Fluoreszenzdetektion

Für die Genexpressionsanalysen wurden die BaF3-Klone 48 h mit Doxycyclin kultiviert und die RNA wurde mit dem mirVana Kit (2.2.12.2) isoliert. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und diese mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei der Hybridisierung binden die markierten einzelsträngigen cDNAs an

ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nichtgebundene cDNAs wurden durch Waschen entfernt und das Fluoreszenzsignal jeder Position des Microarrays wurde mit einem Laser ausgelesen. cDNA-Synthese, Markierung, Hybridisierung und das Auslesen der Chips wurden vom Labor für funktionelle Genomforschung der Charité (LFGC) durchgeführt. Die Intensitäten wurden verrechnet und es wurde ein Wert / Probe Set generiert.

2.5.2. Statistische Auswertung

Genlisten

Die erhaltenen Rohdaten wurden von der Arbeitsgruppe „computational diagnostics group“ (Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin bzw. jetzt Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg) ausgewertet. Nach der Normalisierung der reinen Intensitäten wurden die Daten mit der Software Limma (linear models for microarray data, Bioconductor) statistisch ausgewertet. Diese Software wird angewendet, wenn die Probenanzahl $n < 10$ ist, weil dann keine Permutationstests durchgeführt werden können. Die resultierenden Werte korrespondieren mit der false discovery rate (fdr). Diese beschreibt die Anzahl der fälschlicherweise verworfenen Null-Hypothesen von allen verworfenen Null-Hypothesen. Für die Analyse der differentiellen Genexpression wurde die Gruppe der *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Klone mit der Gruppe der *ETV6/RUNX1*-negativen (Leervektor-) Klone verglichen. Die differentiell exprimierten Gene bzw. die sie repräsentierenden Probe Sets wurden anhand der fdr-Werte gelistet.

Überrepräsentationsanalyse

Für die Überrepräsentationsanalysen wurden die Listen differentiell exprimierter Gene anhand der Datenbank der Gene Ontology (GO) ausgewertet. GO klassifiziert Gene in eine Hierarchie, wobei Genprodukte mit ähnlicher Funktion zusammengefasst werden. Die drei Hauptklassen sind: Biologischer Prozess, Zellulärer Bestandteil und Molekulare Funktion. Für die Evaluierung der p-Werte wurden hypergeometrische Tests mit den Genlisten durchgeführt, wobei hoch- und herunterregulierte Gene getrennt gewertet wurden. Eine signifikante Überrepräsentation besteht bei einem p-Wert $\leq 10^{-5}$.

cross species comparison

Affymetrix stellt Listen der Probe Sets orthologer Gene in verschiedenen Spezies zur Verfügung, die auf der Grundlage der Datenbanken HomoloGene, UniGene und RefSeq (NCBI) ermittelt wurden. Die Affymetrix-Liste Mouse430_2.na23.ortholog.csv enthielt 1.038.873 orthologe Probe Set-Paare des MG430 2.0 zu allen anderen Affymetrix-Chips. Zur Validierung der Liste wurden die orthologen Probe Sets des MG430 2.0 und des HG-U133-Plus 2.0 bestimmt. Die verwendete Affymetrix-Liste enthielt für die beiden Arrays 79779 Paare, die 31942 murine Gene auf 31827 humanen Genen abbildeten. Demnach wurden für 94% der Gene auf dem murinen Chip (31942 / 34000) und für 83% der Gene auf dem humanen Chip (31827 / 38500) orthologe Gene auf dem jeweiligen anderen Chip zugeordnet. Ein Vergleich von Genlisten aus unterschiedlichen Spezies ist anhand dieser Methode somit realistisch. Für den Vergleich muriner und humaner Expressionsdaten wurden die Probe Sets auf dem MG430 2.0 und dem HG-U133A, auf dem die Diagnose- und Rezidivproben hybridisiert worden waren, einander zugeordnet. Mit den orthologen Probe Sets wurden Permutationen durchgeführt.

2.5.3. Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Mit dem Internet-Portal oPOSSUM ist die statistische Analyse von Gengruppen möglich, um überrerpäsentierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) beispielsweise in einem Set differenziell exprimierter Gene zu identifizieren, die auf eine Koregulation hinweisen.[170]

Die Analyse mit oPOSSUM basiert auf einer Datenbank vorhergesagter, evolutionär konservierter TFBS. oPOSSUM bezieht Sequenzen aus ENSEMBL (EBI, WTSI). Mit diesen Daten wird ein phylogenetisches Footprinting durchgeführt, um konservierte Regionen zu identifizieren, da diese häufiger regulatorische Regionen enthalten. In diesen konservierten Regionen werden TFBS anhand der PSSMs (position site scoring matrices) aus der JASPAR-Datenbank identifiziert. Koexprimierte Gene werden von einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren koreguliert. Der Z-Score vergleicht das Auftreten der TFBS in dem bestimmten Genset mit der zufällig beobachteten Häufigkeit der TFBS, die anhand eines Kontrollsets von Genen bestimmt wird (Backgroundrate). Der Fisher-Score vergleicht den Anteil koexprimierter Gene, die eine bestimmte TFBS enthalten, mit der Anzahl der Gene in

einem Backgroundset und gibt somit die Wahrscheinlichkeit einer nicht-zufälligen Beziehung zwischen dem analysierten Genset und der TFBS an.

Die Analyse erfolgte mit SSA (single site analysis) Version 2.0. Es wurden folgende Parameter verwendet: Konservierungslevel: Top 10% of conserved regions (min. conservation 70%); matrix match score: 80%; upstream length sequence: 10000 bp; downstream length sequence: 5000 bp. Eine TFBS ist überrepräsentiert, wenn der Z-Score > 10 und der Fisher-Score < 0,01 ist.

2.6. Proteomanalyse

Die Proteomanalyse erfolgte mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI. In der 2D-Gelelektrophorese werden native Proteinlysate zuerst anhand ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt (isoelektrische Fokussierung, IEF). Im zweiten Schritt schließt sich eine SDS-PAGE an, in der die denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Auflösung der 2D-PAGE kann bis zu 10.000 Proteinspots betragen, wodurch sich eine Methode ergibt, die es ermöglicht, einen Gesamtüberblick über die in einem definierten System vorhandenen Proteine zu bekommen. Ausgewählte Proteine können aus dem Polycrylamidgel gelöst und massenspektrometrisch analysiert werden.

Zur Quantifizierung der aufgetrennten Proteine wurden analytische 2D-Gele angefertigt, für die Massenspektrometrie wurden präparative Gele angefertigt.

2.6.1. 2D-Gelelektrophorese

Für die Herstellung von Proteinlysaten für die 2D-Gelelektrophorese wurden die Zellen ausgesät (10^6 / ml) und 48 h mit 500 ng/ml Doxycyclin stimuliert. Die Proteine wurden wie unter 2.2.15 beschrieben extrahiert.

2.6.1.1. Isoelektrische Fokussierung

IEF-Gele (Immobiline Dry Strips pH 3-10, GE Healthcare) wurden nach der Rehydrierungsmethode mit Protein beladen. Bei dieser Methode diffundieren die Proteine mit dem Rehydrierungspuffer in die getrockneten Gele. Dazu wurden für analytische Gele 200 µg Protein und für präparative Gele 600 µg Protein mit Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff, 1% [w/v] CHAPS, 0,4% [w/v] DTT, 0,5% [v/v] Ampholyte [Pharmalyte 3-10, Amersham], 0,002% [w/v] Bromphenolblau) auf ein Gesamtvolumen von 340 µl aufgefüllt und zwischen den Elektroden eines Ettan II

IPG-Phor-Geräts (Amersham) verteilt. Ein IEF-Gel wurde aufgelegt, mit Mineralöl überschichtet und 10 – 20 h rehydriert. Die Proteine wurden bei steigender Spannung aufgetrennt: 30 V (14 h), 200 V (1 min), 500 – 1000 V (Gradient, 1 h), 1000 – 8000 V (Gradient, 1 h) und 8000 V (Fokussierung, 3 h). Anschließend wurde das IEF-Gel 10 min in Equilibrierungspuffer 1 (6 M Harnstoff, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30% Glycerin, 100 mM DTT) und 10 min in Equilibrierungspuffer 2 (6 M Harnstoff, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30% Glycerin, 70 mM Iodoacetamid) auf dem Schüttler equilibriert. Dabei wurden die nativen Proteine mit SDS gesättigt und die freien Thiolgruppen mit Iodoacetamid blockiert.

2.6.1.2. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde der IEF-Gelstreifen auf ein Polyacrylamidgel (15% PAA, 0,2% Bisacrylamid, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,03% TEMED, 1,28% APS) aufgelegt. Die Dicke analytischer Gele betrug 0,75 mm, die Dicke präparativer Gele 1 mm. Der Laufpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen: 0,3% Tris Base, 1,44% Glyzin, 20% SDS und Bromphenolblau in der Anodenpufferkammer. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15°C für 15 min bei 75 mA und für ca. 8 h bei 835 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in Fixierlösung (50% Ethanol, 10% Eisessig) fixiert und anschließend gefärbt.

2.6.1.3. Silberfärbung

Für analytische Zwecke wurden SDS-Gele nach der Methode von Jungblut gefärbt.[171] Das Gel wurde 2 h in Färbelösung 1 (0,5 M Natriumazetat, 0,1% Natriumthiosulfat, 30% Ethanol, 0,5% Glutaraldehyd) gefärbt, zweimal 20 min in Wasser gespült, 30 min in Färbelösung 2 (0,1% Silbernitrat, 0,01% Formalin) gefärbt und wiederum einige Sekunden gespült. Die Entwicklung erfolgte mit 2,5% Natriumkarbonatlösung bei Beobachtung unter leichtem Schütteln, bis die Proteinspots gut sichtbar waren. Nach 20 min Inkubation in 0,05 M Titriplex III zum Stoppen der Entwicklungsreaktion wurden die gefärbten Gele für 2,5 h bei 80°C in einem Gel Trocknungsschrank unter Vakuum getrocknet.

Für die Identifizierung von Proteinspots mit MALDI-Massenspektrometrie wurden präparative SDS-Gele nach der Färbemethode von Shevchenko gefärbt.[172] Dabei wird der Vernetzer Glutaraldehyd weggelassen, der die Färbung zwar empfindlicher macht, Proteine jedoch kovalent an die Acrylamidmatrix bindet.

2.6.2. Quantifizierung der Proteinspots mit Delta2D

Von jedem der 3 BaF3-TO/TA-Klone und der 3 BaF3-TO/LV-Klone wurden jeweils drei 2D-Gele angefertigt. Diese wurden zunächst auf einem Lichtkasten optisch ausgewertet. Die so identifizierten potenziell differenziell exprimierten Proteinspots wurden mit der Software Delta2D (Decodon, Deutschland) quantifiziert. Dazu wurden die Gele mit einem Densitometer (GS-800, Bio-Rad) digitalisiert. Delta2D arbeitet mit der „image-warping-first“-Methode. Dabei werden Gele zunächst deckungsgleich gemacht (Warping). Aus den deckungsgleichen Gelen wird ein Fusionsgel gebildet und anhand dieses ein Konsensmuster der Proteinspots erstellt. Das Konsensmuster wird anschließend auf die einzelnen Gele zurück übertragen, die Gele werden normalisiert und die Spots quantifiziert. Es wurde folgende Strategie für das Warping angewendet: Die Gele eines Klons wurden jeweils auf ein Hauptgel bezogen. Anschließend wurden diese Hauptgele auf ein Mastergel für alle Gruppen bezogen. Dadurch wurden einige Gele direkt, andere indirekt aufeinander bezogen.

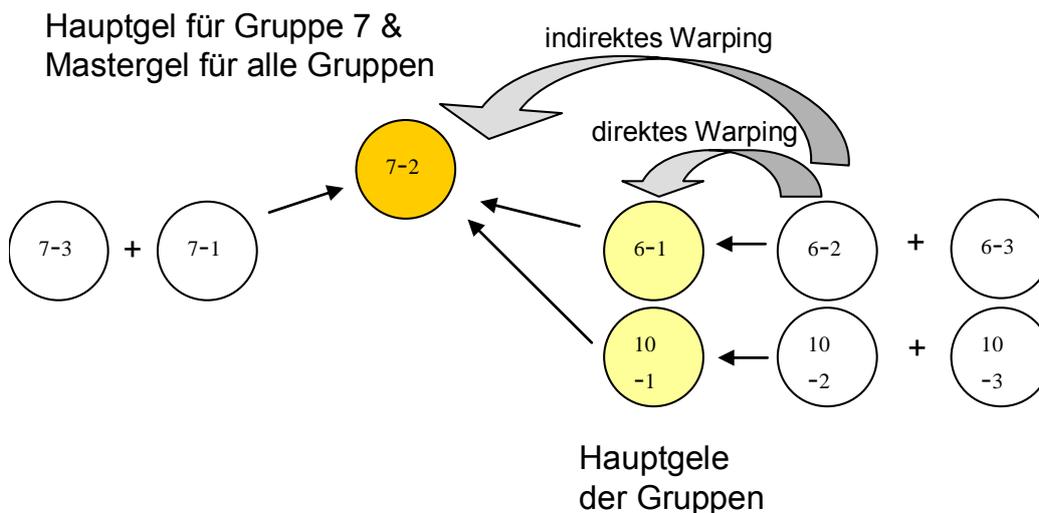


Abb. 2.4: Warpingstrategie, beispielhaft für die Gele der BaF3-TO/TA-Klone dargestellt.

Anhand der mit Delta2D quantifizierten Werte wurde das Expressionsverhältnis zwischen den BaF3-TO/TA- und den BaF3-TO/LV-Klonen bestimmt. War das Verhältnis > 2 oder $< 0,5$ galt das Protein als differenziell exprimiert.

2.6.3. Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden ausgewählte Proteinspots aus den präparativen Gelen von #6 und #7 (BaF3-TO/TA) und #5 (BaF3-TO/LV) ausgestochen. Trypsinverdau, Aufreinigung der Proteine aus dem Gel, MALDI-TOF und Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde von der AG Klose

(Charité) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software MascotDaemon anhand der Datenbank SwissProt (Version vom 29.07.09) analysiert.

2.6.4. Statistische Auswertung

Proliferationsmessungen (3.2.1, 3.3.2), Apoptose- / Nekrosemessungen (3.2.2), Zellzyklusmessungen (3.2.3), sowie die Messung der Steigerung der IL-6-Sekretion durch $\text{TNF}\alpha$ (3.3.1) wurden mit dem Students T-Test ausgewertet. Gemessene Unterschiede waren signifikant, wenn $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung eines stabilen zellulären Systems mit induzierbarer TEL/AML1-Expression

3.1.1. Auswahl und Charakterisierung der Zielzelllinie

Für die Etablierung eines stabilen Zellsystems mit induzierbarer TEL/AML1-Expression wurden die murine pro-B-Zelllinie BaF3, sowie die humanen B-lymphoblastoiden Zelllinien TMM und RO ausgewählt, die ein frühes Stadium der Hämatopoese repräsentieren und einen nahezu diploiden Karyotypen und keine konsistenten numerischen oder strukturellen chromosomalen Veränderungen aufweisen.

BaF3-Zellen wachsen schnell und weisen kaum Apoptose auf. Sie proliferieren in Abhängigkeit von IL-3, was ihren unreifen B-Zell-Charakter widerspiegelt. BaF3 ist eine häufig verwendete Zelllinie in Transgen-Experimenten. Die Zelllinien TMM und RO sind schwerer zu kultivieren. Sie haben eine höhere Apoptoserate als BaF3 und reagieren empfindlich auf exogenen Stress. Eine genaue Beschreibung der Zelllinien laut DSMZ befindet sich im Anhang (7.1).

3.1.2. Gentransfer in hämatopoetische Zellen

Der Gentransfer in die hämatopoetischen Zelllinien erfolgte onkoretroviral. Für die Expression wurden das RevTet-ON-System (Clontech, 2.2.8) verwendet, da dieses System die Möglichkeit bietet, die klonierten Transgene konditionell zu exprimieren. Das System besteht aus zwei retroviralen Vektoren. Vom regulatorischen Plasmid pRevTet-ON erfolgt die konstitutive Expression des reversen Transaktivators (rtTA). Auf dem experimentellen Plasmid pRevTRE befindet sich das Transgen unter der Kontrolle des minimalen, induzierbaren Promotors (Abb. 2.3).

Die cDNAs von *ETV6*-, *RUNX1*- bzw. *ETV6/RUNX1* lagen im Expressionsvektor pCMV5 (2.1.4) vor. Die Inserts wurden vollständig sequenziert (2.2.11) und wiesen keine Mutationen auf. Bei *RUNX1* handelte es sich um die Form, die für *RUNX1c* kodiert (Abb. 1.3). Die cDNA von *ETV6/RUNX1* beinhaltete u.a. Exon 2 von *RUNX1* (1.5.1).

3.1.2.1. Umklonierung der *ETV6*-, *RUNX1*- und *ETV6/RUNX1*-Sequenzen aus dem Vektor pCMV5 in den experimentellen Vektor des RevTet-ON-Systems

Wegen fehlender geeigneter Restriktionsstellen zum Klonieren der cDNAs in das experimentelle Plasmid pRevTRE wurde das Creator-kompatible RevTet-System mit dem Vektor pLP-RevTRE benutzt (2.2.8).

In-Fusion-PCR-Klonierung

Die cDNAs von *ETV6*, *RUNX1* und *ETV6/RUNX1* wurden durch In-Fusion-PCR-Klonierung in den Donorvektor pDNR-Dual des Creator-Systems eingebracht (2.2.7.1). Für jede Klonierung wurde mindestens ein Klon ohne Amplifizierungsfehler selektiert.

Tab. 3.1: Die durch In-Fusion-PCR-Klonierung generierten pDNR-Dual-Klone mit den verifizierten Sequenzen von *ETV6*, *RUNX1* oder *ETV6/RUNX1*

Plasmid	Bezeichnung des Klons
pDNR-Dual + <i>ETV6/RUNX1</i> + Kozak-Sequenz	TEL/AML1+K #1
pDNR-Dual + <i>ETV6</i> + Kozak-Sequenz	TEL+K #3-fb-1
pDNR-Dual + <i>RUNX1</i> + Kozak-Sequenz	AML1+K #4-fb-3
pDNR-Dual + <i>ETV6/RUNX1</i>	TEL/AML1-OK #6-D550-2
pDNR-Dual + <i>ETV6</i>	TEL-OK #14
pDNR-Dual + <i>RUNX1</i>	AML1-OK #5-D550-2

Creator-Rekombination

Anschließend wurden die cDNA-Sequenzen von *ETV6*, *RUNX1* und *ETV6/RUNX1* mittels Cre-Rekombinase-vermittelter Rekombination vom Donorvektor in den Akzeptorvektor pLP-RevTRE überführt (2.2.7.2). Die in Tabelle Tab. 3.1 aufgeführten Klone wurden als Donorvektoren verwendet. Die Rekombination der cDNA-Sequenzen in pLP-RevTRE erfolgte mit und ohne Kozak-Sequenz.

Tab. 3.2: Durch Creator-Rekombination generierte pLP-RevTRE-Klone mit den cDNAs von *ETV6*, *RUNX1* oder *ETV6/RUNX1*

Plasmid	Bezeichnung des Klons
pLP-RevTRE + <i>ETV6/RUNX1</i> + Kozak-Sequenz	TA+K 1-8
pLP-RevTRE + <i>ETV6</i> + Kozak-Sequenz	TEL+K 3-1
pLP-RevTRE + <i>RUNX1</i> + Kozak-Sequenz	AML1+K 4-1
pLP-RevTRE + <i>ETV6/RUNX1</i>	TA-OK 6-1
pLP-RevTRE + <i>ETV6</i>	TEL-OK 14-h
pLP-RevTRE + <i>RUNX1</i>	AML1-OK 5-1

3.1.3. Virenproduktion und Infektion der Zielzellen

Virenproduktion

Dualtrope bzw. pantrope Viren wurden mit den Verpackungszelllinien PT67 und GP2-293 wie unter 2.3.6.1 beschrieben hergestellt. Stabile virenproduzierende PT67 wiesen einen Titer von $\sim 5 \times 10^3$ CFU / ml auf. Laut Hersteller haben stabile PT67-Zellen im Optimalfall einen Titer von 10^4 CFU / ml. Da die Expression von VSV-G für Zellen toxisch ist, erfolgte die Produktion pantroper Viren in GP2-293 transient.

Infektion der Zielzellen

Um die Infektionsrate zu optimieren, wurden HEK-293- und BaF3-Zellen mit pLEGFP-C1-kodierenden Viren infiziert (2.3.6.2 und 2.3.6.3). Die Transfektionsrate der Verpackungszellen und die Infektionsrate der Zielzellen wurden durch die Analyse der GFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer bestimmt (Tab. 3.3).

Pantrope Viren (GP2-293) zeigten ein besseres Ergebnis bei der Infektion adhärenter HEK-293-Zellen als dualtrope Viren (PT67) (Tab. 3.3, 1. Experiment). Die Folgeversuche 2 und 3 verdeutlichten, dass die Transfektionsrate und damit der Virentiter maßgeblich für die Infektionseffizienz sind.

BaF3 wurden in Retronectin-beschichteten Zellkulturplatten infiziert. Durch mehrmalige Inkubation der Platten mit Virensuspension, bei der die Viren an das Retronectin binden, wurde die Anzahl der eingesetzten Viren gesteigert. Bei getrennter FACS-Analyse wies die an Retronectin gebundene Zellfraktion eine geringere Infektionsrate (BaF3-fest, 1%) als die Fraktion der im Kulturüberstand befindlichen Zellen (BaF3-Üb, 5%) auf.

Tab. 3.3: Infektionsexperimente mit dem onkoretroviralen GFP-Vektor pLEGFP-C1 an adhärenen Kontrollzellen (HEK) und hämatopoetischen Suspensionszellen (BaF3). Einzelne Experimente sind durch 1. - 4. markiert.

	Verpackungszellen	Plasmid	Transfektionsrate	Zielzellen	Infektionsrate	Methode
1.	PT67	pLEGFP-C1	-	HEK	2%	Polybrene
	GP2-293	pLEGFP-C1	95%	HEK	13%	Polybrene
2.	GP2-293	pLEGFP-C1	52%	HEK	8%	Polybrene
				BaF3	1%	Retronectin
3.	GP2-293	pLEGFP-C1	8%	HEK	0%	Polybrene
				BaF3	0%	Retronectin
4.	GP2-293	pLEGFP-C1	18%	BaF3-Üb	5%	Retronectin
				BaF3-fest	1%	

Die Herstellung transgener BaF3-Zellen mit den viralen Vektoren des RevTetON-Systems erfolgte letztendlich mit verschiedenen Infektionsmethoden, die in Tab. 3.4 zusammengefasst sind. Während der anschließenden Selektion stabiler Zellen (2.3.3) wurden die vitalen Zellen ggf. mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (2.3.4).

Tab. 3.4: Transgene Zelllinien. Mit verschiedenen Methoden wurden durch retroviralen Gentransfer die beiden Vektoren des RevTetOn-Systems sukzessiv in BaF3 stabil integriert.

Zelllinie + Vektor		transgene Zelllinie	Verpackungszelllinie	Infektionsmethode
BaF3	+ pRevTet-On	BaF3-TO	PT67	Retronectin (2.3.6.3)
	↓			
BaF3-TO	+ pLP-RevTRE- <i>ETV6/RUNX1</i>	BaF3-TO/TA	PT67	Retronectin (2.3.6.3)
BaF3-TO	+ pLP-RevTRE- <i>ETV6/RUNX1</i>	BaF3-TO/TA	GP2-293	Retronectin-Üb (2.3.6.3), Ficoll
BaF3-TO	+ pLP-RevTRE	BaF3-TO/LV	GP2-293	Ko-Kultur (2.3.6.4), Ficoll

Die Infektion und Selektion stabiler TMM- und RO-Zellen war mit diesen Methoden nicht möglich.

3.1.3.1. Konzentrieren der Viren und Infektion im 96-Well-Format

Für die Infektion der humanen hämatopoetischen Zelllinien TMM und RO wurde ein weiterer Optimierungsversuch unternommen.

Pantrope Viren wurden mit Amicon-Zentrifugationsröhrchen konzentriert und die Zielzellen im 96-Well-Format infiziert (2.3.6.5). Im Test mit pLEGFP-C1 wurden die in Tab. 3.5 aufgeführten Infektionsraten erzielt:

Tab. 3.5: Infektionsrate der Zielzellen bei Infektion im 96-Well-Format nach Konzentrieren der Viren

Zielzelllinie	Infektionsrate
HEK	41%
BaF3	17%
RO	24%
TMM	3%

Mit konzentriertem Virenüberstand konnten die Infektionsraten bei HEK und BaF3 jeweils etwa um das Vierfache gesteigert werden. Obwohl ein Viertel der RO-Zellen im Test GFP-positiv waren, konnten keine stabilen Zellen selektiert werden, da diese Zelllinie zu empfindlich auf exogenen Stress (Infektion, Selektion, Ficoll-Aufreinigung) reagierte. TMM-Zellen waren trotz Verwendung eines pantropen Virus und konzentrierter Virensuspension nicht infizierbar.

3.1.4. Isolierung von BaF3-Klonen

Basalexpression und Induzierbarkeit der ETV6/RUNX1-Expression

Zunächst wurde die Funktionalität des Tet-On-Systems in BaF3-TO/TA (von PT67) (Tab. 3.4) getestet. Dazu wurden mittels real time PCR (2.2.5) die Basalexpression, sowie die Induzierbarkeit der *ETV6/RUNX1*-Expression bestimmt. Als Basalexpression wird die Expressionshöhe des Transgens im nicht induzierten Zustand bezeichnet, die Induzierbarkeit beschreibt die Steigerung der Expression bei Induktion des Promotors mit Doxyzyklin.

BaF3-TO/TA (von PT67) exprimierten *ETV6/RUNX1* sowohl im induzierten, als auch im nicht induzierten Zustand, und zwar in gleichem Maße. Die Expressionstärke war vergleichbar mit REH-Zellen.

Um Zelllinien zu generieren, die eine sehr geringe Basalexpression und eine hohe Induzierbarkeit der *ETV6/RUNX1*-Expression aufweisen, wurden deshalb aus der polyklonalen BaF3-TO/TA-Population Klone isoliert (2.3.7) und diese auf die gleiche Weise getestet.

Da die ersten drei untersuchten Klone bei Stimulation mit Doxyzyklin keine *ETV6/RUNX1*-Expression aufwiesen, wurde bei den restlichen Klonen zunächst die Integration des Provirus in das Genom geprüft.

genomische Integration des Provirus

Mittels PCR wurde die Integration des viralen Vektors pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1* in das Genom der 32 BaF3-TO/TA-Klone (von PT67) untersucht.

Tab. 3.6: PCR-Analyse der genomischen Integration des viralen Vektors pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1* in BaF3-TO/TA-Klonen (von PT67)

Zielsequenz der PCR	positive Klone	erfolgter Nachweis
ETV6/RUNX1	2 / 32	Integration des Provirus; Verwechslung bzgl. des Vektors (pLPRevTRE- <i>ETV6/RUNX1</i> ↔ pLPRevTRE) ausgeschlossen
Hygromycin	32 / 32	Integration des Provirus
3'-loxP-Stelle	6 / 6	keine Rekombination an loxP-Stellen

Alle 32 Klone waren positiv für den ORF der Hygromycinresistenz. Das zeigte, dass der virale Vektor in das Genom der BaF3-Zellen integriert worden war und die Antibiotikum-Selektion erfolgreich war. Allerdings waren nur 2 Klone (#16, #36) *ETV6/RUNX1*-positiv.

In der Annahme, dass das Insert durch erneute Rekombination an den loxP-Stellen deletiert worden war, wurde eine PCR mit loxP-überspannenden Primern gemacht (PCP1 / PCP2). Alle 6 untersuchten Klone waren positiv, was zeigte, dass der Sequenzverlust nicht mit den loxP-Stellen korrelierte, sondern dass Mutation an

anderen Stellen der viralen Sequenz stattgefunden hatte. Folglich musste bei den in der PCR als *ETV6/RUNX1*-positiv identifizierten Klonen die gesamte *ETV6/RUNX1*-Sequenz auf Vollständigkeit untersucht werden.

3.1.4.1. Sequenzverlust der ins Genom integrierten Proviren

Die *ETV6/RUNX1*-Sequenz und angrenzende virale Sequenzen im Genom ausgewählter BaF3-TO/TA-Klone (von PT67) wurden mittels PCR (Tab. 7.3, Versuch 3) und Sequenzierung geprüft. Primerpaare wurden so gewählt, dass die amplifizierten Fragmente an den Enden überlappten. Zum Vergleich wurde das Plasmid pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1* als Template eingesetzt.

Es wurden die Klone 16 und 36 (*ETV6/RUNX1*-positiv in der initialen PCR-Analyse, Tab. 3.6), sowie 4, 5, und 6 (*ETV6/RUNX1*-negativ) untersucht. Die detaillierte Untersuchung der viralen Sequenzen zeigte, dass die Veränderungen nicht an bestimmte Sequenzabschnitte gebunden waren (Abb. 3.1).

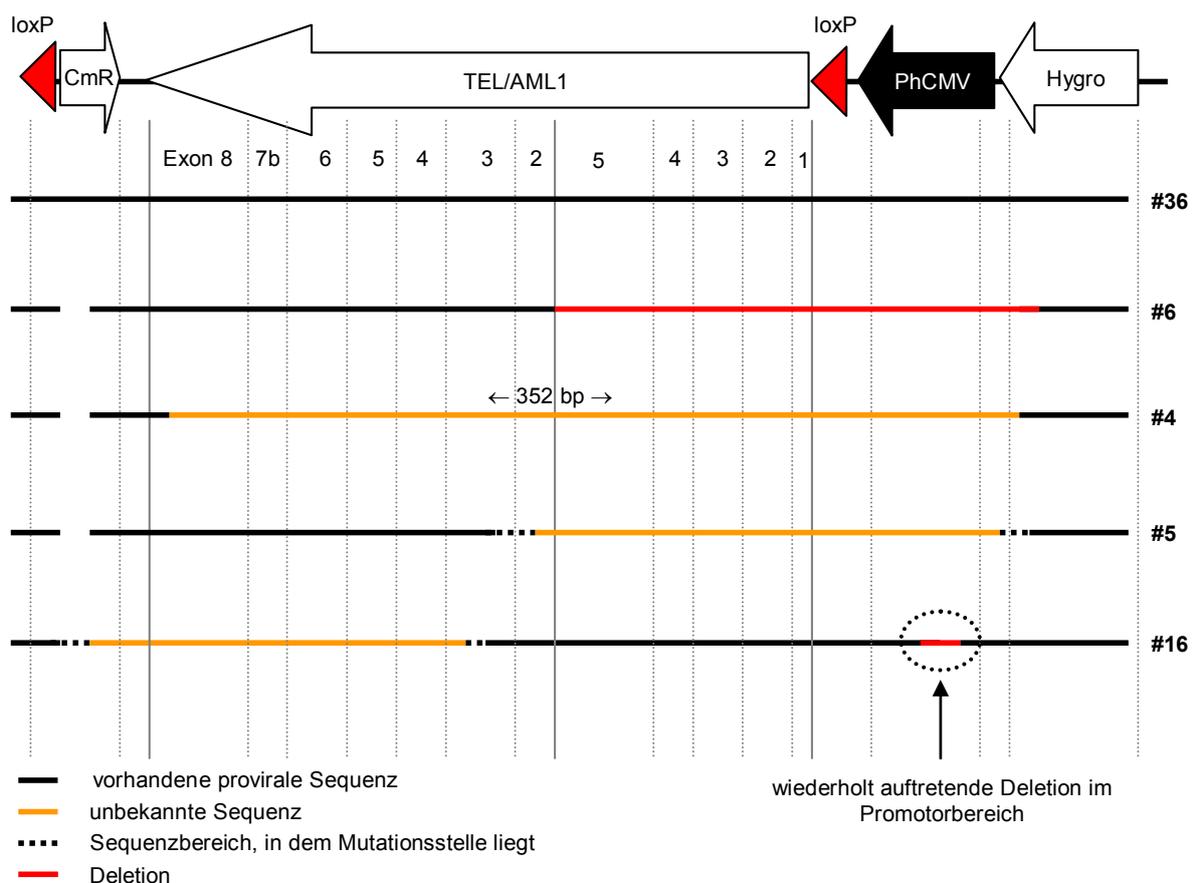


Abb. 3.1: Grafische Darstellung der durch PCR-Screening und Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse bzgl. der proviralen Sequenzen der BaF3-TO/TA-Klone (von PT67)

Mutationen traten sowohl in der *ETV6/RUNX1*-Sequenz, als auch in anderen Teilen der viralen Sequenz auf, z.B. in den ORFs für Chloramphenicol- und Hygromycinresistenz (Abb. 3.1). Es traten sowohl Deletionen (#6), als auch Insertionen (#4, #5, #16) auf. Durch PCR über den Mutationsbereich und anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente konnten die genauen Mutationsstellen lokalisiert werden. Die Insertion in #4 bestand aus 352 bp, deren Ursprung durch Sequenzvergleich (Blast) mit pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1* und dem murinen Genom nicht identifiziert werden konnte. #36 war der einzige Klon, dessen Sequenz vollständig und unverändert war.

Die Häufung der Mutationsstellen im 3'-Bereich des Hygromycin-ORF lässt sich durch die Antibiotikum-Selektion der Zellen erklären, da Klone, bei denen mehr von dieser Sequenz deletiert ist, ihre Resistenz verlieren.

In #16 fiel eine kleinere Deletion im Promotorbereich auf. Da auch der minimale Promotor ein wichtiger Bestandteil des viralen TetON-Vektorsystems ist, wurde diese Sequenz bei allen BaF3-TO/TA-Klonen (von PT67) auf Deletionen untersucht.

Mit dem Primerpaar Hygro-for / P-hCMV-rev, die in der Mitte des Hygromycin-ORFs und am 3'-Ende des minimalen Promotors binden, wurde der Promotorbereich amplifiziert. Bei nur fünf von 32 Klonen war die PCR positiv, resultierte jedoch in unterschiedlich großen Fragmenten. Die Sequenzierung dieser Fragmente zeigte in vier von fünf Klonen eine Deletion innerhalb des minimalen Promotors. Nur #36 wies die komplette Sequenz auf.

Interessanterweise traten die Deletionen an unterschiedlichen Stellen im minimalen Promotor auf, betrafen jedoch immer die gleiche Sequenz (Abb. 3.2). Das 3'-Ende der Deletionen war in allen vier Klonen identisch und wies die gleiche Sequenz auf, wie sie direkt 5' der verschiedenen Deletionsstarts zu finden ist.

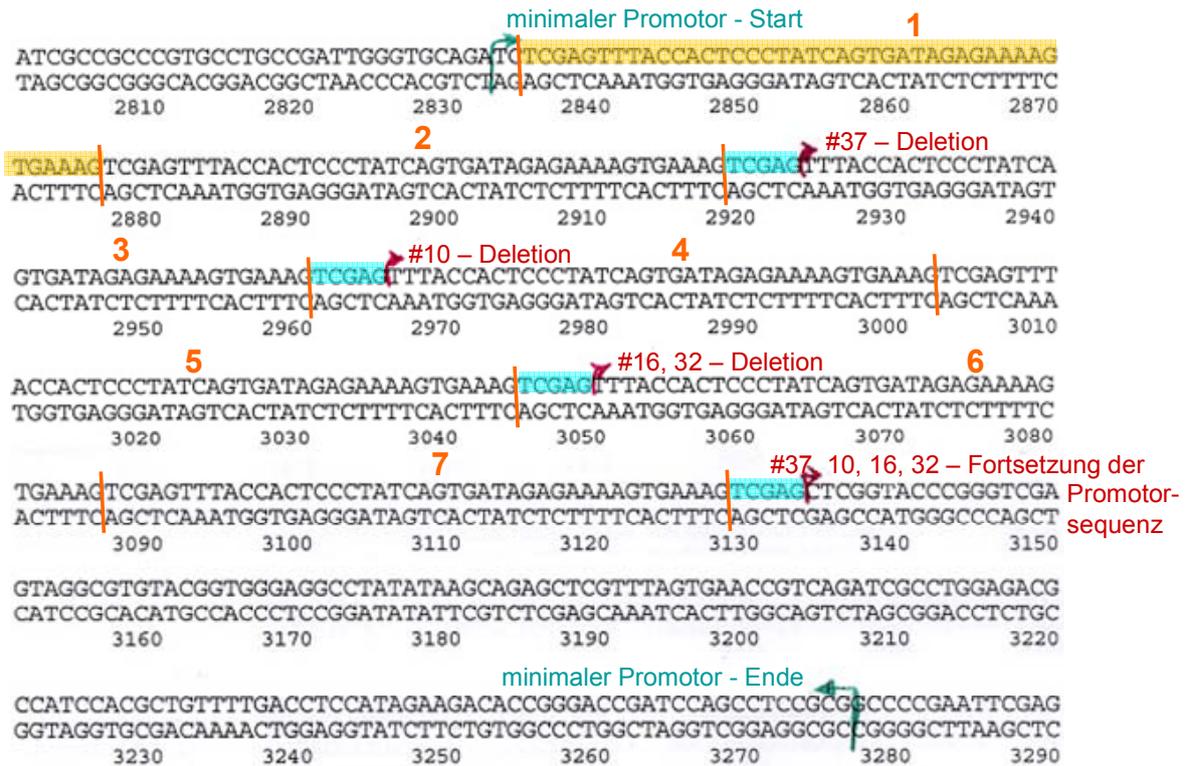


Abb. 3.2: Lage der Deletionen im minimalen Promotor von BaF3-TO/TA #10, #16, #32 und #34. Beginn und Ende des minimalen Promotors sind grün markiert, Deletionsbeginn und -ende rot. Die sieben identischen Sequenzabschnitte des TRE innerhalb des minimalen Promotors sind orange dargestellt. Hellblau unterlegt sind Sequenzen, die direkt 5' vom Deletionsbeginn bzw. -ende liegen.

Von den Klonen, die mit PT67-generierten Viren infiziert worden waren, wies demnach nur einer von 32 Klonen die gesamte relevante provirale Sequenz auf, so dass dieser Infektionsansatz verworfen wurde.

Isolierung von Klonen aus BaF3-TO/TA und BaF3-TO/LV (GP2-293)

Aus den polyklonalen Zelllinien BaF3-TO/TA und BaF3-TO/LV, die mit GP2-293-verpackten Viren infiziert worden waren, wurden 25 Klone bzw. 10 Klone isoliert (2.3.7).

Von diesen wurde genomische DNA isoliert (2.2.2.3) und ein PCR-Screening mit den in Tab. 3.7: aufgelisteten Primerpaaren durchgeführt, um die Integration der Proviren und das Vorhandensein der *ETV6/RUNX1*-Sequenz, sowie der Sequenz des minimalen Promotors zu prüfen. Die Ergebnisse des PCR-Screenings sind in Abb. 3.3 und Abb. 3.4 abgebildet.

Tab. 3.7: Kontrolle der BaF3-TO/LV- und BaF3-TO/TA-Klone (von GP2-293) mittels PCR-Screening

Primerpaar	Kontrolle von	getestete Klone
Neo-for / -rev	Integration von pRevTet-ON	TO/TA, TO/LV
TEL-A / AML1-B	Integration von pLP-RevTRE- <i>ETV6/RUNX1</i> und Vorhandensein des Transgens	TO/TA
minCMV-for2 / PCP2	Promotorbereich	TO/LV
minCMV-for2 / Tel93	Promotorbereich	TO/TA

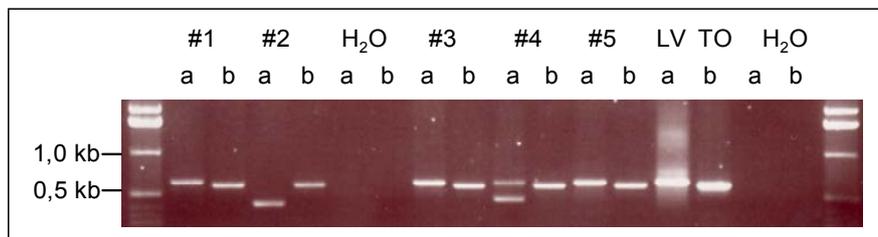


Abb. 3.3: PCR-Screening der BaF3-TO/LV-Klone (von GP2-293).
a: minCMV-for2 / PCP2: Promotorbereich des experimentellen Plasmids pLP-RevTRE (LV)
b: Neo-for / Neo-rev: Neomycinresistenzgen des regulatorischen Plasmids pRev-TetON (TO)

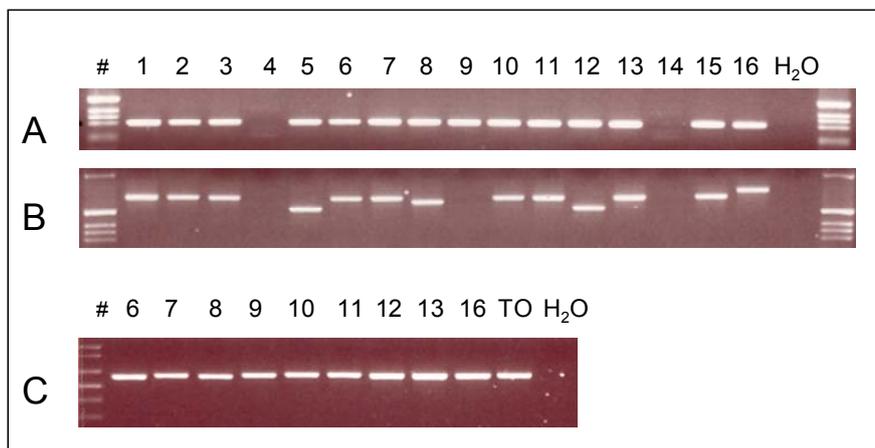


Abb. 3.4: PCR-Screening der BaF3-TO/TA-Klone (von GP2-293).
A: TEL-A / AML1-B: Transgen-Sequenz des experimentellen Plasmids pLP-RevTRE-*ETV6/RUNX1*
B: minCMVfor2 / TEL93: Promotorbereich des experimentellen Plasmids
C: Neo-for / Neo-rev: Neomycinresistenzgen des regulatorischen Plasmids pRev-TetON (TO)

Auch in den Klonen, die mit GP2-293-generierten Viren hergestellt wurden, treten Mutationen auf, jedoch seltener als in BaF3-Klonen, die mit PT67-generierten Viren infiziert wurden.

Von den getesteten Leervektor-Klonen BaF3-TO/LV #1 – 5 wiesen #2 und #4 genetische Veränderungen im Promotorbereich auf (Abb. 3.3). Bei den BaF3-TO/TA-Klonen wiesen die Klone 4 und 14 Mutationen in der *ETV6/RUNX1*-Sequenz auf, sowie die Klone 4, 5, 8, 9, 12, 14 und 16 Veränderungen im Promotorbereich (Abb. 3.4). Die *NeoR*-PCR zum Nachweis der Integration des regulatorischen Plasmids war bei allen Proben positiv.

Aufgrund der Ergebnisse des PCR-Screenings wurden die Klone BaF3-TO/LV #1, #3, #5 und BaF3-TO/TA #6, #7, #10, #11 für weitere Untersuchungen ausgewählt und zunächst detailliert charakterisiert.

3.1.5. Verifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression in den Klonen

3.1.5.1. Basalexpression und Induzierbarkeit der *ETV6/RUNX1*-Expression

Die Zellen wurden 48 h mit oder ohne Doxycyclin kultiviert, und mittels RT-PCR wurde die Expression von *ETV6/RUNX1* untersucht. Sowohl die induzierten, als auch die nicht induzierten Klone wiesen *ETV6/RUNX1*-Expression auf (Abb. 3.5).

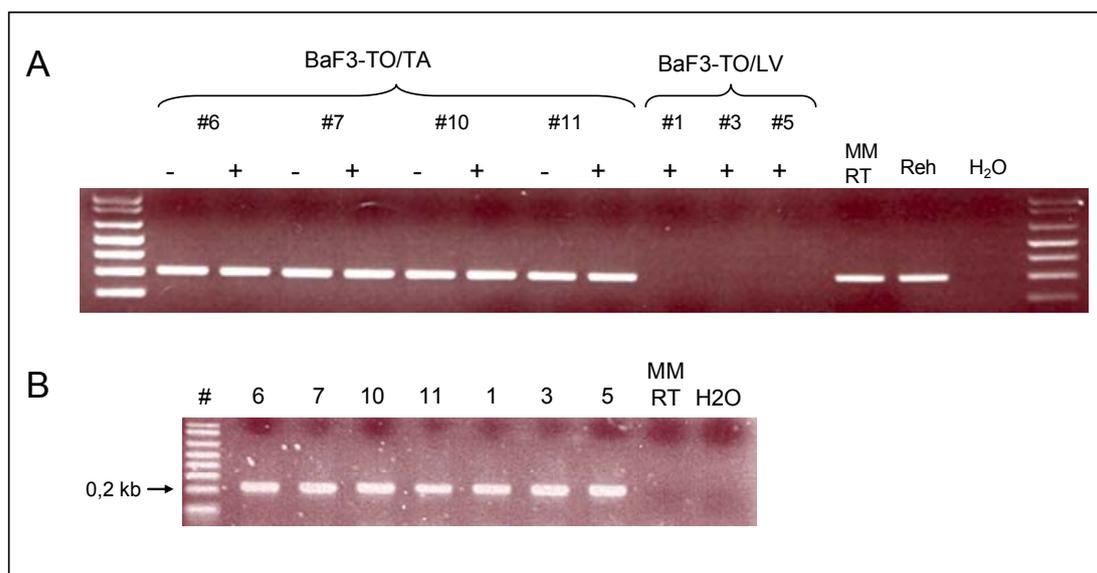


Abb. 3.5: Untersuchung der Basalexpression und der Induzierbarkeit der BaF3-TO/TA-Klone mittels RT-PCR. - steht für nicht induzierte Proben, + steht für Doxycyclin-induzierte Proben; BaF3-TO/LV-Klone wurden als Negativkontrolle mitgeführt und REH als Positivkontrolle

A: TEL-A / AML1-B

B: murRPL13A

Da es sich bei dem Transgen um cDNA handelte, stimmten die *ETV6/RUNX1*-Sequenzen in gDNA und cDNA überein. Um falsch-positive Banden in den nicht stimulierten Proben, verursacht durch eventuelle gDNA-Verunreinigung, auszuschließen, wurde eine Kontroll-PCR mit Primern für das murine RPL13A-Gen durchgeführt. Diese Primer flankieren ein Intron und resultieren bei gDNA in einem Fragment von 550 bp und bei cDNA in einem Fragment von 200 bp. Da alle Proben nur die 200 bp-Bande aufwiesen, lag keine relevante Verunreinigung mit gDNA vor. BaF3-TO/TA-Klone exprimieren somit auch im nicht induzierten Zustand das Transgen.

Aufgrund der bis dahin gewonnenen Erfahrung mit dem RevTet-System in BaF3 wurde die Wahrscheinlichkeit, induzierbare Klone ohne Basalexpression zu finden, als sehr gering eingeschätzt. Deshalb wurde auf die Induzierbarkeit der *ETV6/RUNX1*-Expression verzichtet und die ausgewählten Klone wurden für die weiteren Experimente verwendet.

3.1.5.2. Sequenzierung von *ETV6/RUNX1*

Für die Sequenzanalyse des *ETV6/RUNX1*-Transgens wurde die gDNA der BaF3-TO/TA-Klone isoliert und in einer PCR-Reaktion wurden Fragmente amplifiziert. Diese wurden dann aufgereinigt und als Templates für die Sequenzier-PCR verwendet (Tab. 7.1).

In der *ETV6/RUNX1*-Sequenz der Klone 6, 10 und 11 gab es keine Mutationen. In Klon 7 hatte bei Nukleotid 414 (stromabwärts vom ATG) ein Basenaustausch G→A stattgefunden. Da beide Codons (CTG → CTA) für Leucin kodieren, handelte es sich um eine stille Mutation (silent mutation), die die Funktion des Proteins nicht beeinflusst.

3.1.5.3. Quantifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression

Die Expression des Transgens wurde mittels real time PCR quantifiziert (2.2.5). Als interner Standard für die Normalisierung der Proben wurde eine real time PCR mit TaqMan-Sonde für das murine house keeping Gen GusB etabliert. Die Quantifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression erfolgte anhand einer REH-Standardreihe, unverdünnte REH-cDNA exprimierte *ETV6/RUNX1* 1fach.

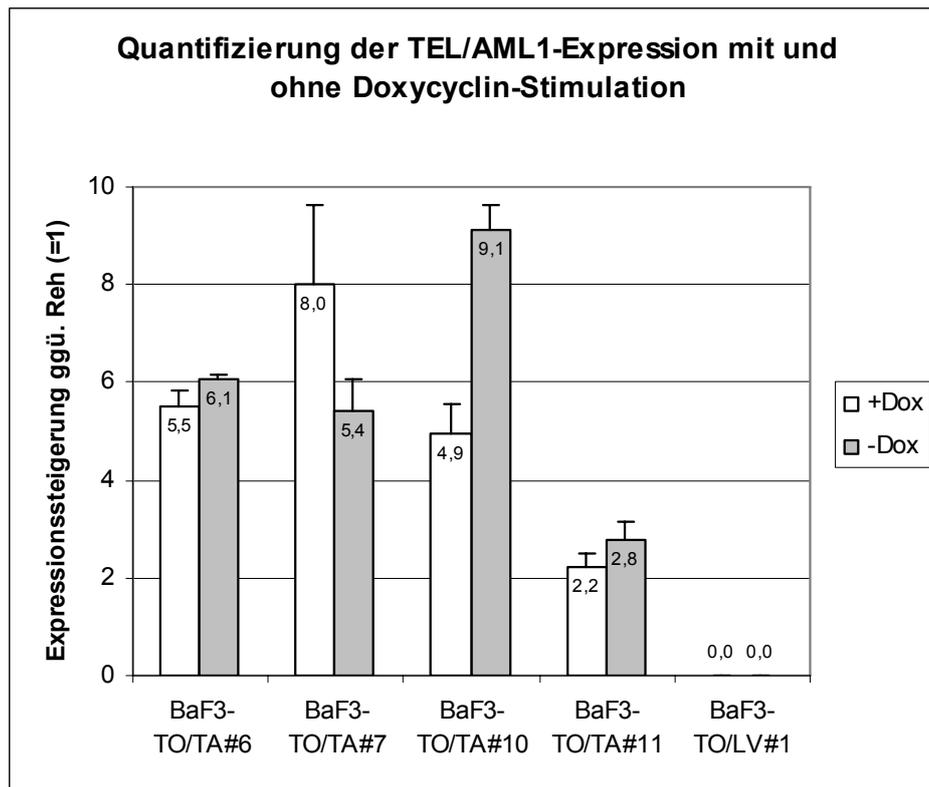


Abb. 3.6: Quantifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression in den BaF3-Klonen mit und ohne Doxycyclinstimulation bezogen auf REH-Zellen (Expression = 1), BaF3-TO/LV#1 wurde als Negativkontrolle mitgeführt; abgebildet ist der Mittelwert aus drei Messwerten mit Standardabweichung

Die *ETV6/RUNX1*-Expression war in BaF3-Klonen 3 – 9fach höher, als in REH-Zellen (Abb. 3.6). Wie schon in der RT-PCR (3.1.5.1) nachgewiesen wurde, exprimierten die BaF3-Klone *ETV6/RUNX1* auch im nicht induzierten Zustand. Während Doxycyclin keinen Effekt auf die Expressionsstärke in #6 und #11 hatte, wurde die Expression durch Doxycyclin in #7 hochreguliert, in #10 dagegen herunterreguliert.

Um die Bedingungen konstant zu halten, wurden die Klone vor den folgenden Experimenten immer 48 h mit Doxycyclin stimuliert.

3.1.5.4. Nachweis der *ETV6/RUNX1*-Expression im Western Blot

Mit dem Western Blot (2.2.16) wurde die Expression vollständiger *ETV6/RUNX1*-Fusionsproteine nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde Gesamtproteinextrakt aus REH-Zellen verwendet.

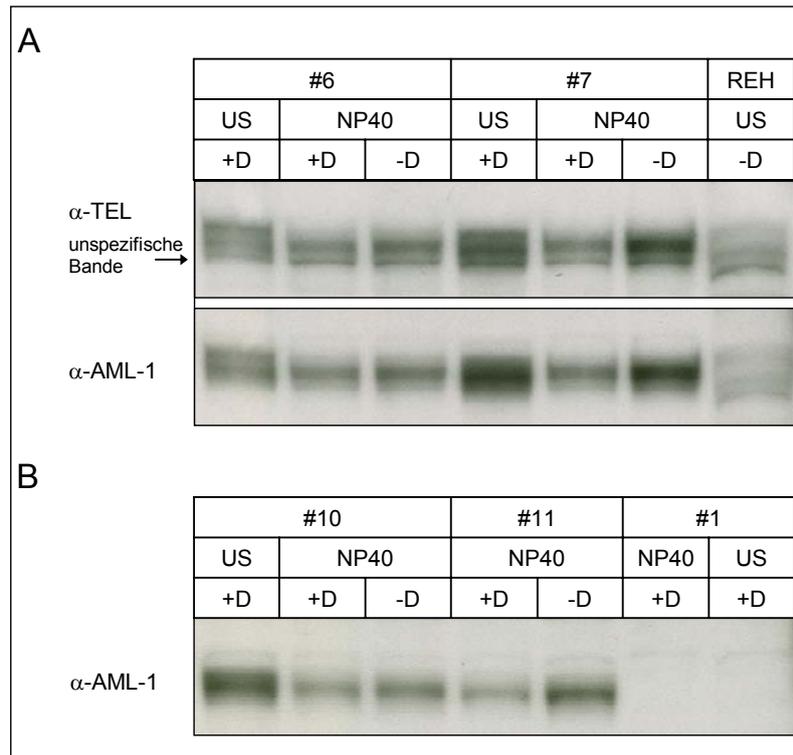


Abb. 3.7: Nachweis der ETV6/RUNX1-Expression auf Proteinebene. Western Blot mit Gesamtproteinextrakt von A: BaF3-TO/TA Klon 6 und 7 und B: Klon 10 und 11 bzw. dem Leervektor-Klon 1. Die Extraktion erfolgte mit NP40-Puffer und Qiasredder (NP40) oder SDN-Puffer und Ultraschall (US). Als Positivkontrolle wurde Proteinextrakt von REH-Zellen mitgeführt.

Je nach Extraktionsmethode wurden in den BaF3-TO/TA-Klonen 1 – 2 spezifische Banden mit einer Größe von 96 und 106 kDa nachgewiesen. Durch die im SDN-Puffer verwendeten Detergenzien werden die Kerne effizienter lysiert und durch Ultraschallbehandlung werden chromatingebundene Proteine besser gelöst. Die mit α -TEL nachgewiesene unterste Bande wurde auch in BaF3-TO/LV#1 detektiert (hier nicht abgebildet) und ist unspezifisch. Die Banden der in den BaF3-TO/TA-Klonen nachgewiesenen Proteine entsprachen den in REH-Zellen detektierten Banden, wobei in REH-Zellen zusätzlich noch eine 90 kDa große Bande detektiert wurde.

3.2. Untersuchung des Effekts der *ETV6/RUNX1*-Expression in BaF3-Zellen

Zunächst wurde in zellbiologischen Assays die Auswirkung der ETV6/RUNX1-Expression auf die Proliferation, Apoptose bzw. Nekrose und die Zellzyklusverteilung von BaF3-Zellen untersucht.

3.2.1. Proliferation

Die Proliferation der BaF3-Klone wurde im MTS-Assay (2.4.1) über einen Zeitraum von 72 Stunden gemessen. Die Verwendung eines Zellzählgeräts (Casyton, Schär) gewährleistete eine sehr genaue Bestimmung der Zellzahl und somit den Einsatz möglichst gleicher Zellzahlen. So konnten die verschiedenen Klone miteinander verglichen werden.

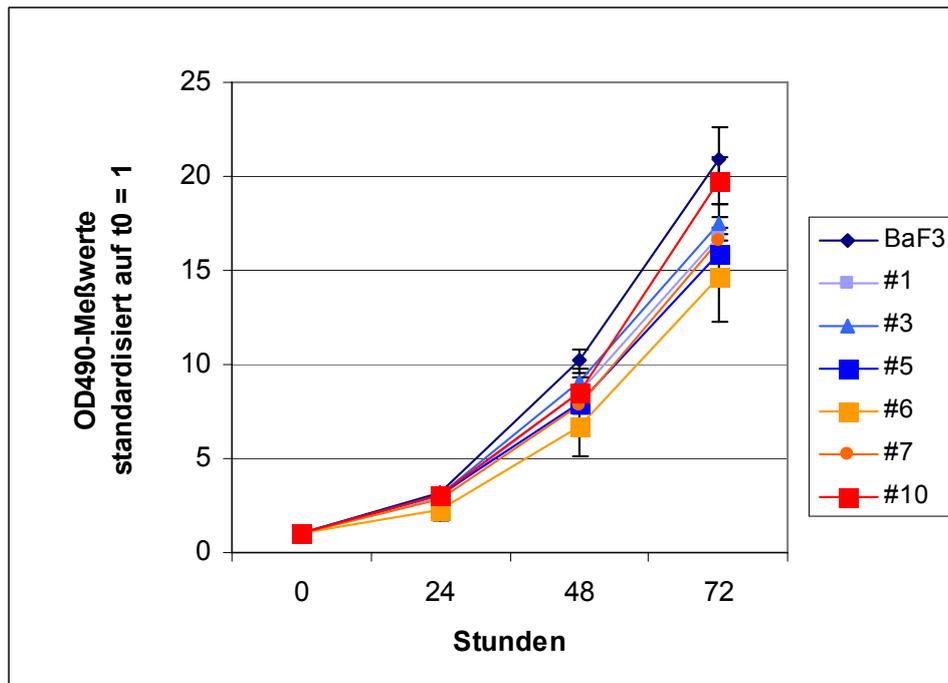


Abb. 3.8: Proliferationsmessung der BaF3-Klone. Die Messwerte der OD bei 490 nm wurden auf $t_0 = 1$ standardisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten und die Standardabweichung.

Die Proliferation der BaF3-Klone 6, 7 und 10 mit Transgen unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Proliferation der Klone ohne Transgen (Abb. 3.8). Die Expression des Fusionsproteins wirkte also nicht proliferationsfördernd in den BaF3-TO/TA-Klonen.

Von anderen Leukämie-assoziierten Fusionsproteinen (BCR/ABL, TEL/PDGFR) ist bekannt, dass Zellen durch ihre Expression transformiert werden. Die Expression dieser Fusionsproteine ermöglicht BaF3-Zellen IL-3-unabhängiges Wachstum. In einem weiteren Versuch wurde deshalb die Proliferation der BaF3-Klone während Kultur ohne IL-3 gemessen.

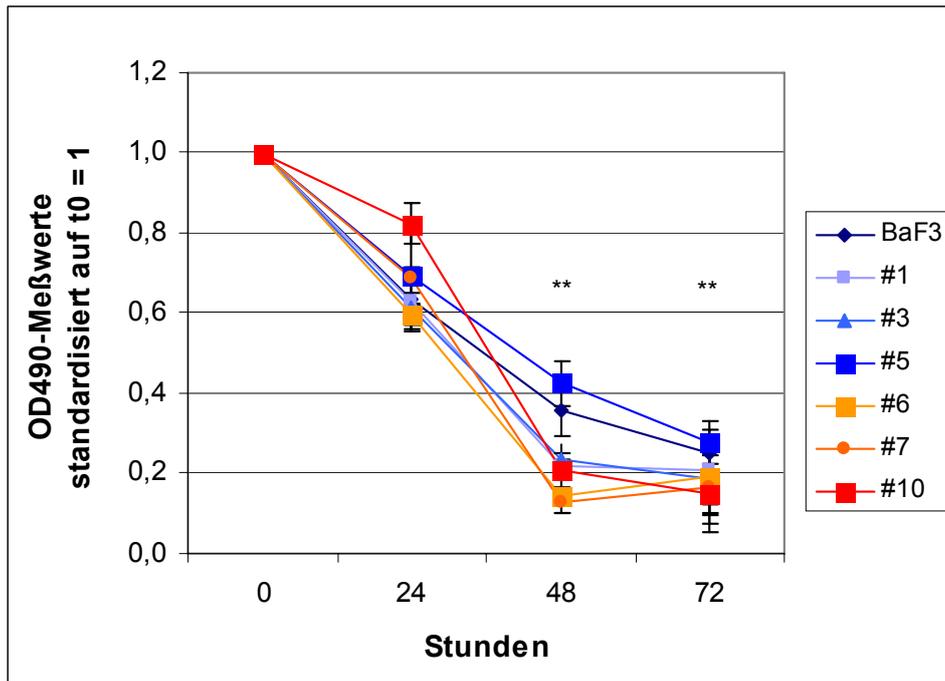


Abb. 3.9: Effekt der *ETV6/RUNX1*-Expression auf das Wachstum der BaF3-Zellen in Kultur ohne IL-3. BaF3-Klone mit Leervektor (#1, 3, 5) wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Die Messwerte der OD bei 490 nm wurden auf $t_0 = 1$ standardisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten und die Standardabweichung.

Die Expression von *ETV6/RUNX1* vermittelte keine Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation in BaF3-Zellen. Allerdings unterschied sich die Abnahme der Proliferation 48 und 72 Stunden nach IL-3-Entzug signifikant zwischen den BaF3-Klonen mit und ohne Transgen (t_{48h} : $p = 7,7 \times 10^{-9}$, t_{72h} : $p = 0,003$), wobei die BaF3-TO/LV-Klone eine höhere Proliferationsrate aufwiesen (Abb. 3.9).

3.2.2. Apoptose und Nekrose

Für die Messung der Apoptose- und Nekroserate wurden die Zellen mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (2.4.2).

Es gab keine signifikant unterschiedliche Verteilung der BaF3-Klone mit und ohne Transgen in den Quadranten (Abb. 3.10). Die Expression des Fusionsproteins beeinflusste nicht die Rate der Spontanapoptose bzw. Nekrose der BaF3-Klone.

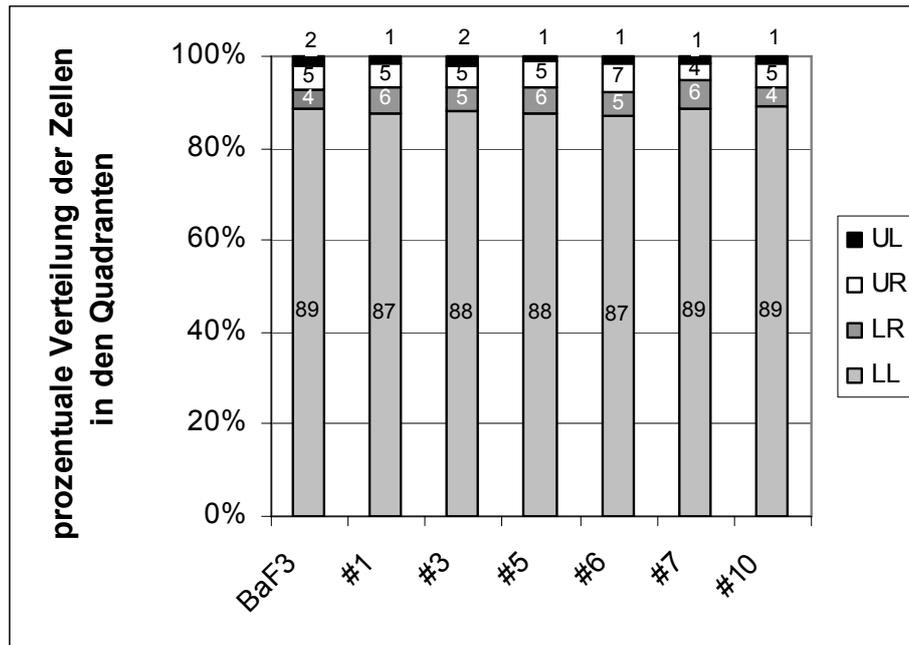


Abb. 3.10: Messung der Apoptose- und Nekroserate der BaF3-Klone. LL bezeichnet ungefärbte, vitale Zellen, UR spätapoptotische und nekrotische Zellen, die doppelt-gefärbt sind. Im LR-Quadranten befinden sich AnnexinV-positive, frühapoptotische Zellen und in UL Propidiumiodid-positive, nekrotische Zellen. Es sind die Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten dargestellt.

3.2.3. Zellzyklusverteilung

Für die Messung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (2.4.3).

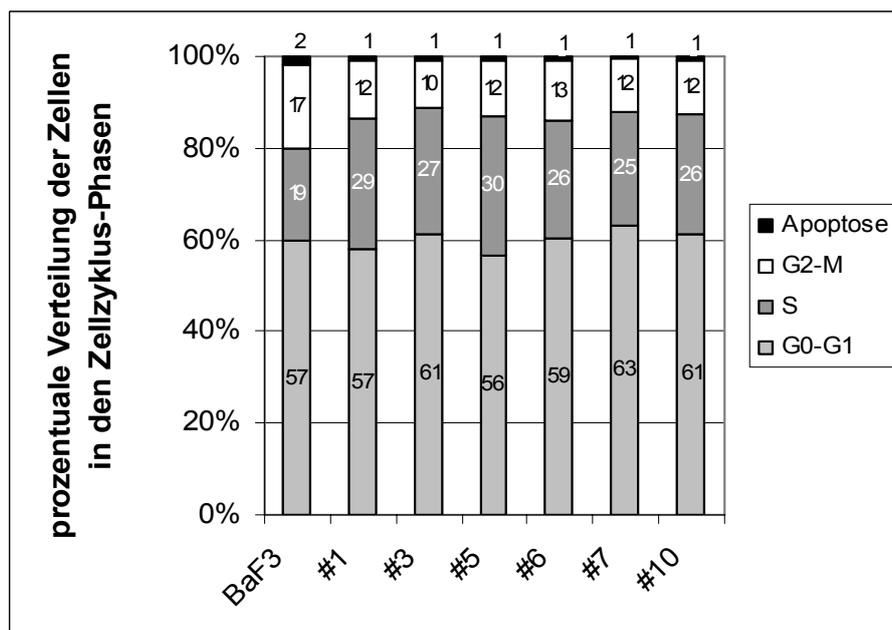


Abb. 3.11: Messung der Zellzyklusverteilung. Abgebildet sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten.

Die Expression von *ETV6/RUNX1* in den BaF3-Klonen 6, 7, und 10 resultierte in einem signifikant höheren Anteil von Zellen in der G0-G1-Phase gegenüber BaF3-Klonen ohne Transgen ($p = 0,002$), sowie einem dafür signifikant geringerem Anteil der Klone 6, 7 und 10 in der S-Phase ($p = 6 \times 10^{-6}$).

3.2.4. Genexpressionsanalyse

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Expression von *ETV6/RUNX1* auf die Genexpression von BaF3-Zellen hat, wurden genomweite Genexpressionsanalysen mit Microarrays durchgeführt (2.5). Bei der statistischen Auswertung wurde die Gruppe der *ETV6&/RUNX1*-positiven mit der Gruppe der *ETV6&/RUNX1*-negativen BaF3-Klone verglichen. Es wurden Listen der hoch- und herunterregulierten Gene erstellt, Überrepräsentationsanalysen durchgeführt und die Genlisten mit humanen Expressionsdaten verglichen (2.5.2).

3.2.4.1. Genliste

Die statistische Auswertung der Microarraydaten ergab eine Liste von 250 Probe Sets bei einer Toleranzgrenze von $fdr \leq 0,05$ (7.3). Die *fdr* (false discovery rate) gibt die Anzahl falsch positiver Werte an, d.h. dass 5% der 250 Probe Sets (= 12,5) falsch positiv sind. Die 250 Probe Sets repräsentierten 181 differenziell exprimierte Gene, von denen 77 (= 110 Probe Sets) hochreguliert und 104 (= 140 Probe Sets) herunterreguliert waren. 66 Gene hatten einen Fold Change von > 2 . Das am stärksten hochregulierte Gen hatte einen Fold Change von 29, das am stärksten herunterregulierte Gen einen Fold Change von 25.

3.2.4.2. Überrepräsentationsanalyse

Von den 181 differenziell exprimierten Genen waren 130 in der GO-Kategorie (2.5.2) „Molekulare Funktion“ annotiert, 131 in der Kategorie „Biologischer Prozess“ und 124 in der Kategorie „Zellulärer Bestandteil“. In der Kategorie „Biologischer Prozess“ waren die in Tab. 3.8 aufgelisteten Prozesse signifikant überrepräsentiert.

Tab. 3.8: Überrepräsentationsanalyse der differenziell exprimierten Gene. Aufgeführt sind die in der GO-Kategorie „Biologischer Prozess“ signifikant überrepräsentierten Prozesse.

GO ID	GO Term	upreg. p-value	upreg. int. Count	downreg. p-value	downreg. int. Count	GO Count
GO:0006952	defense response	1,00E-06	14	0.350	5	583
GO:0009607	response to biotic stimulus	2,00E-06	14	0.216	6	604

Die GO-Termini „defense response“ und „response to biotic stimulus“ waren durch folgende hochregulierte Gene (upreg. int. counts) überrepräsentiert: *Blnk*, *CD55*, *IL8rb*, *Cblb*, *Nalp10*, *Tnf*, *Apaf1*, *Prkca*, *Slamf1*, *Ifi47*, *Lta*, *Lilrb3*, *IL-6*, *Lat2*.

In der Kategorie „Zellulärer Bestandteil“ war der GO-Terminus „basolateral plasma membrane“ signifikant überrepräsentiert (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Überrepräsentationsanalyse der differenziell exprimierten Gene. Aufgeführt sind die in der GO-Kategorie „Zellulärer Bestandteil“ signifikant überrepräsentierten Prozesse.

GO ID	GO Term	upreg. p-value	upreg. int. Count	downreg. p-value	downreg. int. Count	GO Count
GO:0016323	basolateral plasma membrane	5,00E-06	5	0.273	1	53

Der Terminus war durch folgende hochregulierte Gene überrepräsentiert: *Col17a1*, *Itga6*, *Itgb4*, *Slc12a6*, *Bcar1*.

In der Kategorie „Molekulare Funktion“ war kein Terminus signifikant überrepräsentiert.

3.2.4.3. Vergleich der Genexpressionsdaten muriner und humaner Proben

Um einen Eindruck von der Plausibilität der erhobenen Genexpressionsdaten der BaF3-Klone zu gewinnen, wurden diese mit Daten aus Genexpressionsanalysen von *ETV6/RUNX1*-positiven Patientenproben bei Diagnose [173] und *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidivproben [174] verglichen (Tab. 3.10). Um die Daten statistisch auswerten zu können, wurden zunächst die Probe Sets orthologer Gene einander zugeordnet (2.5.2).

Tab. 3.10: Vergleich der Genexpressionsdaten von murinen *ETV6/RUNX1*-transgenen BaF3-Klonen und humanen *ETV6/RUNX1*-positiven Diagnose- bzw. Rezidivproben

Daten	Array	Probe Sets	Vergleichsdaten	Array	Probe Sets	Ähnlichkeiten
BaF3	MG430 2.0	45101	Diagnosen	HG-U133A	22283	0
BaF3	MG430 2.0	45101	Rezidive	HG-U133A	22283	0

Der statistische Vergleich ergab, dass die Genexpressionsdaten muriner BaF3-Klone und humaner Patientenproben keine Ähnlichkeiten aufwiesen ($p \leq 0,01$).

Da die Fusionsproteine ETV6/RUNX1 und RUNX1/MTG8 (AML1/ETO) beide als dominante Repressoren von RUNX1-Zielgenen wirken, wurden die in BaF3-Klonen differenziell exprimierten Gene zusätzlich mit publizierten Genexpressionsdaten für RUNX1/MTG8 verglichen. Die von Shimada et al. [175] publizierten Genexpressionsdaten wurden mittels Differential Display von transgenen LG-Zellen (murine myeloide Vorläuferzellen) erhoben. Dunne et al. [176] untersuchten die Genexpression in der *RUNX1/MTG8*-exprimierenden Zelllinie Kasumi1 mit RNAi und cDNA-gespotteten Microarrays (Humane Unigene Chip, RZPD), sowie Oligonukleotid-Arrays (HG-U133 Plus 2.0). Diesmal wurden nur die Genlisten anhand der Gennamen verglichen (Tab. 3.11).

Die von Shimada et al. [175] publizierte Genliste enthielt 15 charakterisierte Gene. Sechs dieser Gene waren auch in der Genliste der BaF3-Klone aufgelistet. *GranzymB* wurde in BaF3-Klonen ebenfalls differenziell exprimiert, ist jedoch nicht in der Genliste enthalten, da das Probe Set eine fdr von 0,6 aufwies, der cut off der Liste jedoch bei $fdr \leq 0,5$ lag.

Die Genliste von Dunne et al. [176] umfasste 40 Gene, von denen 5 mit den Genen der Liste der BaF3-Klone übereinstimmten.

Fast alle der übereinstimmenden Gene wurden in gleicher Weise reguliert. Nur die Expression von *Depdc6* und *GranzymB* wurde durch RUNX1/MTG8 hochreguliert, durch ETV6/RUNX1 jedoch herunterreguliert.

Tab. 3.11: Vergleich der durch *ETV6/RUNX1*-induzierten differenziell exprimierten Gene in BaF3-Zellen mit den durch *RUNX1/MTG8*-induzierten differenziell exprimierten Genen in transgenen LG-Zellen (Shimada et al.)[175] und Kasumi1-Zellen (Dunne et al.)[176]

Genname	Regulation in <i>RUNX1/MTG8</i> - exprimierenden Zellen	Regulation in <i>ETV6/RUNX1</i> - exprimierenden BaF3-Klonen	muriner Genname (falls abweichend)
<i>Shimada</i>			
GranzymB	↑	↓	(GranzymeB)
Ctla2b	↑	↑	
Pim2	↓	↓	
human monocyte / neutrophil elastase inhibitor	↑	↑	Serpinb1a
rat β-galactosidase- α2,6-sialyltransferase	↓	↓	St6gal1
IFITM3	↓	↓	
ASPH	↑	↑	
<i>Dunne</i>			
Dusp6	↑	↑	
Cxcr4	↓	↓	
Depdc6	↑	↓	
Myo1F	↓	↓	
Pstpip1	↓	↓	

3.2.4.4. Transkriptionsfaktorbindungsstellen-Analyse

Die 181 in BaF3 differenziell exprimierten Gene (3.2.4.1) wurden anhand des Fold Change sortiert und die Gene in zwei Gruppen gegliedert:

- 1.) Gene mit einem Fold Change > 3 und
- 2.) Gene mit einem Fold Change von 2 – 3.

Insgesamt 66 der 181 differenziell exprimierten Gene hatten einen Fold Change ≥ 2 (Tab. 3.12 und Tab. 3.13). Diese 66 Gene wurden wie unter 2.5.3 beschrieben analysiert, um potenzielle *RUNX1*-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) und somit mögliche direkte *ETV6/RUNX1*-Zielgene zu identifizieren, sowie überrepräsentierte TFBS.

Tab. 3.12: Hochregulierte Gene mit einem Fold Change > 3 bzw. 2 – 3 und Gene mit potenziellen RUNX1-TFBS

Gensymbol	Fold Change d. Probe Sets	Beschreibung	potenzielle RUNX1-TFBS
<i>Gene mit einem Fold Change > 3,0 (=15)</i>			
Serpinb1a	29,1 / 28,8	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	n.a.
Phlda1	7,2	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	-
Ctla2a	6,0 / 5,6 / 3,1	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	n.a.
Nalp10	6,0	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 10	-
Itga6	5,4 / 5,2	integrin alpha 6	+
Lat2	4,9	linker for activation of T cells family, member 2	-
AI586015; Stap1	4,6	STAP-1, Stem cell adaptor protein 1	-
Ela3	4,2 / 3,5 / 2,0 / 1,9 / 1,6	elastase 3, pancreatic	-
Entpd5	3,9 / 3,6 / 3,2 / 3,2 / 2,9	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	+
Gp1ba	3,8	glycoprotein 1b, alpha polypeptide	-
Msh5	3,6 / 3,5	mutS homolog 5 (E. coli)	+
Il6	3,6	interleukin 6	+
Ctla2b	3,1	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	n.a.
Rfk	3,1 / 3,0 / 3,0	riboflavin kinase	-
Il8rb	3,1	interleukin 8 receptor, beta	-
<i>Gene mit einem Fold Change 3,0 – 2,0 (=14)</i>			
Hba-x	2,8	hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex	n.a.
Brwd1	2,8 / 2,3 / 2,0	bromodomain and WD repeat domain containing 1	+
Col17a1	2,7	procollagen, type XVII, alpha 1	+
Lilrb3	2,6	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	n.a.
Tmem64	2,6 / 2,5 / 2,1	transmembrane protein 64	+
Add2	2,5 / 2,4 / 2,0	adducin 2 (beta)	-
Ng23	2,3	Ng23 protein	n.a.
Blnk	2,3	B-cell linker	+
Car13	2,1	carbonic anhydrase 13	-
Slamf1	2,1 / 2,1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	-
Serpini1	2,1 / 1,6	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1	+
Cblb	2,0 / 1,8 / 1,8	Casitas B-lineage lymphoma b	+
Sat1	2,0	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1	-
Ifi47	2,0	interferon gamma inducible protein 47	n.a.

Tab. 3.13: Herunterregulierte Gene mit einem Fold Change > 3 bzw. 2 – 3 und Gene mit potenziellen RUNX1-TFBS

Gensymbol	Fold Change d. Probe Sets	Beschreibung	potenzielle RUNX1- TFBS
<i>Gene mit einem Fold Change > 3,0 (=15)</i>			
Scin	24,9	scinderin	+
Dmpk	14,1 / 2,9	dystrophia myotonica-protein kinase	+
Cfp	8,5	complement factor properdin	+
Sell	7,6 / 6,9	selectin, lymphocyte	-
Tuba8	6,8 / 6,2	tubulin, alpha 8	+
Gzmc; Ctl5; Ccp2	6,7	granzyme C; cytotoxic cell protease 2	n.a.
2900026A02Rik	6,0 / 1,4	RIKEN cDNA 2900026A02 gene	-
Arnt2	5,9 / 1,9 / 1,6 / 1,3	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	+
Muc20	4,2	mucin 20	+
Stg6gal1	3,9 / 2,0	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	+
Ffar2	3,6 / 3,6	free fatty acid receptor 2	-
Lat	3,4	linker for activation of T cells	n.a.
2210412D01Rik	3,3	RIKEN cDNA 2210412D01 gene	n.a.
Stg3gal2	3,1 / 2,8 / 2,7	ST3 beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 2	-
Napsa	3,1	napsin	n.a.
<i>Gene mit einem Fold Change 3,0 – 2,0 (=22)</i>			
1810009M01Rik	3,0	RIKEN cDNA 1810009M01 gene	-
Slc22a3	2,9	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	-
Pstpip1	2,6	proline-serine-threonine phosphatase- interacting protein 1	-
Dmwd	2,6	dystrophia myotonica-containing WD repeat motif	+
Cxcr4	2,6	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	+
Klrb1f	2,6 / 2,5	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F	n.a.
Pim2	2,5	proviral integration site 2	+
Bace1	2,5 / 1,9 / 1,6	beta-site APP cleaving enzyme 1	-
BC029169; Fam20a	2,4	cDNA sequence BC029169;	+
Pilrb1	2,3	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1	n.a.
Ifitm3	2,3	interferon induced transmembrane protein 3	n.a.
Rgl1	2,3 / 1,6	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	+
Rapsn	2,3	receptor-associated protein of the synapse	-
Nrgn	2,3	neurogranin	+
Mt2	2,3	metallothionein 2	-
Pik3cd	2,2 / 2,1 / 1,8	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	n.a.
Rxrip110	2,2	retinoid X receptor interacting protein 110	-
Ccdc102a	2,1 / 1,9	coiled-coil domain containing 102A	+
Usp18	2,1	ubiquitin specific peptidase 18	n.a.
Syt11	2,1	synaptotagmin-like 1	-
Atp8b4	2,1 / 1,4	ATPase, class I, type 8B, member 4	+
0610011104Rik;	2,0 / 1,7 / 1,4	RIKEN cDNA 0610011104 gene	+

Insgesamt 51 von 66 Genen wurden in die Analyse integriert. 26 Gene hatten eine oder mehrere potenzielle RUNX1-TFBS. In 10 hochregulierten Genen gab es 20 RUNX1-TFBS und in 16 herunterregulierten Genen 45 RUNX1-TFBS.

In den 66 Genen gab es keine überrepräsentierten TFBS. Somit ist eine gemeinsame Regulation der analysierten Gene unwahrscheinlich. Auch RUNX1-TFBS waren in den 66 Genen nicht überrepräsentiert (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Statistische Auswertung der TFBS-Analyse für RUNX1. Eine TFBS ist überrepräsentiert, wenn der Z-Score > 10 und der Fisher-Score $< 0,01$ ist.

analysierte Gengruppe	Z score	Fisher score
hoch- und herunterregulierte Gene	4,309	0,75
hochregulierte Gene	-0,51	0,86
herunterregulierte Gene	5,807	0,55

3.2.5. Auswahl differenziell exprimierter Gene für funktionelle Untersuchungen

Aus der Liste der 66 Gene mit einem Fold Change ≥ 2 wurden nach eingehender Literaturrecherche 3 Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt.

SerpinB1a SerpinB1a gehört zu den Serpinen, einer Superfamilie von ca. 500 Proteinen. Serpine sind Inhibitoren von Serin- und Zysteinproteasen. Die Serpine der Klasse B werden als Ovalbumin-Serpine bezeichnet und sind intrazelluläre Proteaseinhibitoren. Zu ihnen gehören auch PAI2 und PI10, die zytoprotektiv gegen $TNF\alpha$ wirken.

Die Überexpression von *SerpinB1a* könnte *ETV6/RUNX1*-exprimierende Zellen vor $TNF\alpha$ -induzierter Apoptose schützen.

IL-6 IL-6 ist ein Zytokin, das die Proliferation, das Überleben und die Selbsterneuerung von HSC und frühen HPC, die den IL-6-Rezeptor exprimieren, fördert. BaF3-Zellen exprimieren den IL-6-Rezeptor nicht, weshalb man den proliferationsstimulierenden Effekt in den Klonen nicht beobachten kann. In Myelomazellen ist IL-6 als autokriner Faktor für Proliferation und Überleben notwendig.

Die Überexpression von *IL-6* könnte in einer verstärkten IL-6-Ausschüttung *ETV6/RUNX1*-exprimierender Zellen resultieren und

dadurch den Zellen einen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil verschaffen.

IL-8Rb Der IL-8-Rezeptor β ist ein Chemokinrezeptor (CXCR2), der Affinitäten für verschiedene Liganden aufweist u.a. IL-8, Gro- β , MIP-2. Liganden für IL-8R β mobilisieren HSC und HPC in Mäusen. Von Endothelzellen sekretiertes IL-8 stimuliert die Extravasation von Leukozyten und wirkt als chemotaktischer Faktor für Neutrophile. IL-8 reguliert die Angiogenese und Metastasierung verschiedener Tumoren.

Die Expression von *IL-8R β* könnte zu einem veränderten Migrationsverhalten *ETV6/RUNX1*-exprimierender Zellen führen, das es ihnen ermöglicht, vorteilhafte Nischen zu erschließen.

3.2.6. Validierung der Genexpressionsdaten mittels real time PCR

Die Genexpressionsdaten der ausgewählten Gene *Serp1b1a*, *IL-6* und *IL-8R β* (CXCR2) wurden zunächst mittels real time quantitativer PCR (2.2.4) validiert. Als Standard wurde die Expression der Gene in parental BaF3-Zellen (= 1) bestimmt. Die Ergebnisse der PCRs sind in Abb. 3.12 und Abb. 3.13 dargestellt.

Für die untersuchten Gene wurde wie in den Microarray-Analysen eine hochregulierte Expression in *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Klonen (#6, #7, #10, #11) im Vergleich zu BaF3-Zellen mit Leervektor beobachtet.

Bei der Quantifizierung von *Serp1b1a* und *IL-8R β* wurde eine Abweichung von #7 beobachtet (Abb. 3.12). Die Quantifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression in den RNA-Präparationen zeigte, dass die Expression des Transgens stark abgenommen hatte, also ein Silencing des Vektors stattgefunden hatte. Dieser Effekt ist bei der Quantifizierung der IL-6-Expression nicht zu beobachten, da hierfür frühere RNA-Präparationen verwendet wurden.

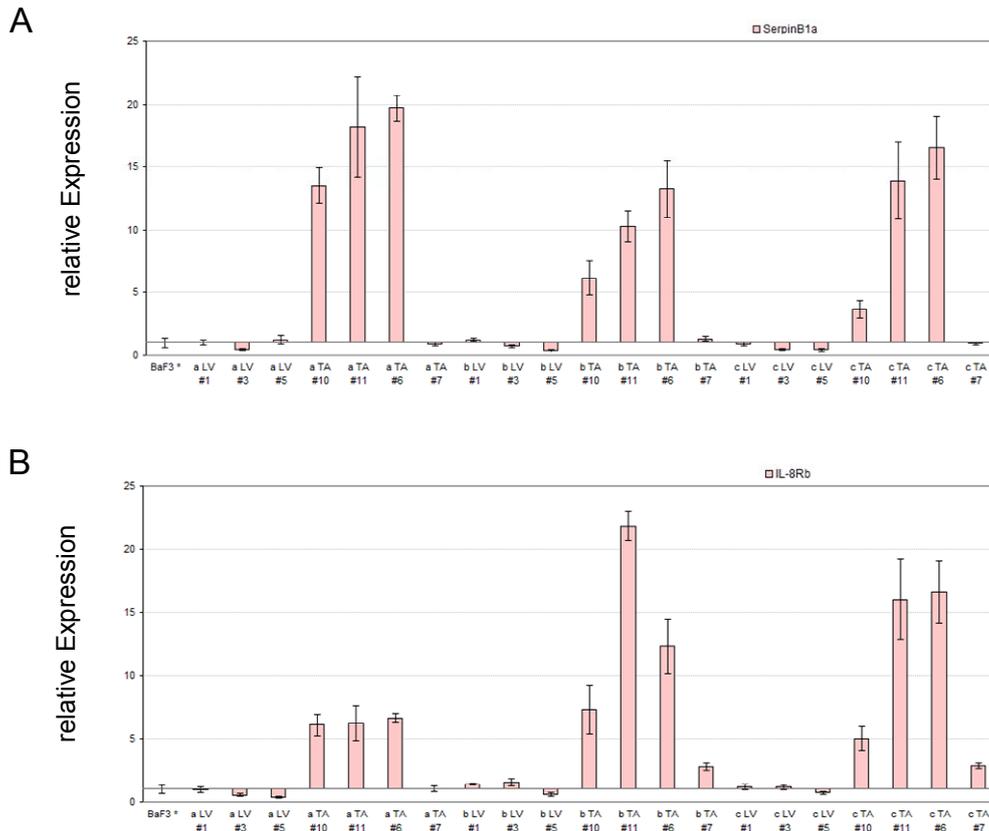


Abb. 3.12: Validierung der differentiellen Genexpression von A: *SerpinB1a* und B: *IL-8Rβ* (*CXCR2*) mittels real time quantitativer PCR. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils drei Messwerten. Für beide Gene wurden drei unabhängige Ansätze (a – c) in einer real time PCR analysiert.

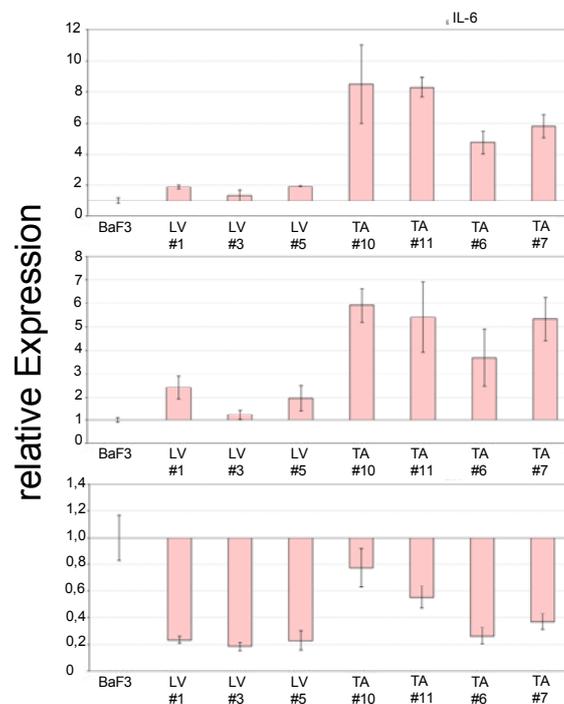


Abb. 3.13: Validierung der differentiellen Genexpression von *IL-6* mittels real time quantitativer PCR. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils drei Messwerten. Drei unabhängige Ansätze wurden in drei real time PCRs analysiert.

Für *SerpinB1a* und *CXCR2* wurden in *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Klonen 13 - 20fach bzw. 10 – 12fach höhere Expressionswerte detektiert. Die Expression von *IL-6* war in den *ETV6/RUNX1*-positiven Klonen jeweils zwei- bis vierfach höher als in den Leervektor-Klonen (Tab. 3.15).

Tab. 3.15: Differenzielle Expression der Gene *SerpinB1a*, *IL-8R β* und *IL-6*. TA / LV beschreibt die Expressionssteigerung des Gens in *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Klonen gegenüber Leervektor-Klonen. Für *SerpinB1a* und *IL-8R β* wurden BaF3-TO/TA #6, 10 und 11 zusammengefasst, für *IL-6* die Klone 6, 7, 10 und 11. Mittelwert aus drei Versuchen und Standardabweichung.

	TA / LV
<i>SerpinB1a</i>	17 \pm 3,6
<i>IL-8Rβ</i>	11 \pm 0,9
<i>IL-6</i>	3 \pm 0,8

3.2.7. Nachweis der differentiellen Expression auf Proteinebene

3.2.7.1. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR2-Expression

Für die Analyse der CXCR2-Expression wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert und im FACS analysiert (2.4.4). Als Kontrolle wurde ein Isotyp-Antikörper verwendet.

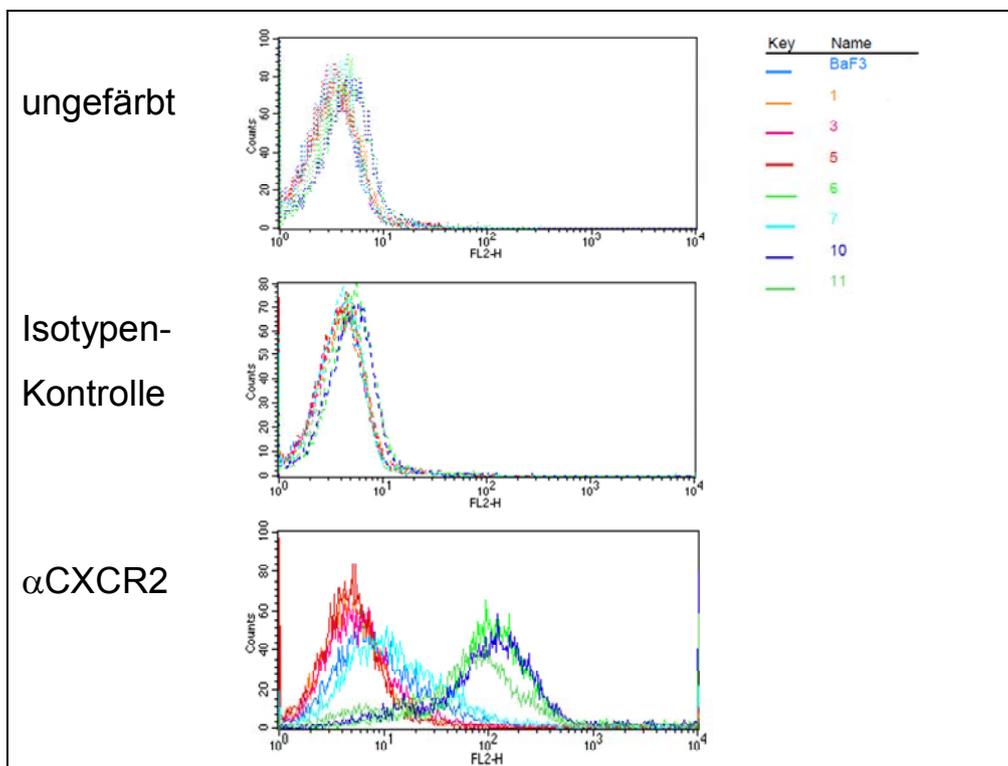


Abb. 3.14: Durchflusszytometrische Analyse der CXCR2-Expression. Es ist ein Experiment abgebildet, das repräsentativ für drei unabhängige Experimente steht.

Native BaF3-Zellen und BaF3-Klone mit Leervektor wiesen praktisch keine membranständigen CXCR2-Rezeptoren auf. Durch die Expression von *ETV6/RUNX1* in BaF3-Zellen wurde die Expression von CXCR2 auf der Zelloberfläche hochreguliert. Bei Klon 7 resultierte das oben beschriebene Silencing des retroviralen Vektors in einer deutlichen Veränderung des Klons auch auf Proteinebene. Die Färbung der Zellen mit der Isotypen-Kontrolle zeigt, dass keine Fc-Rezeptoren auf BaF3-Zellen exprimiert werden, über die eine unspezifische Bindung des CXCR2-Antikörpers erfolgen kann.

3.2.7.2. IL-6-ELISA

Die Konzentration des sekretierten IL-6 wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt (2.4.5).

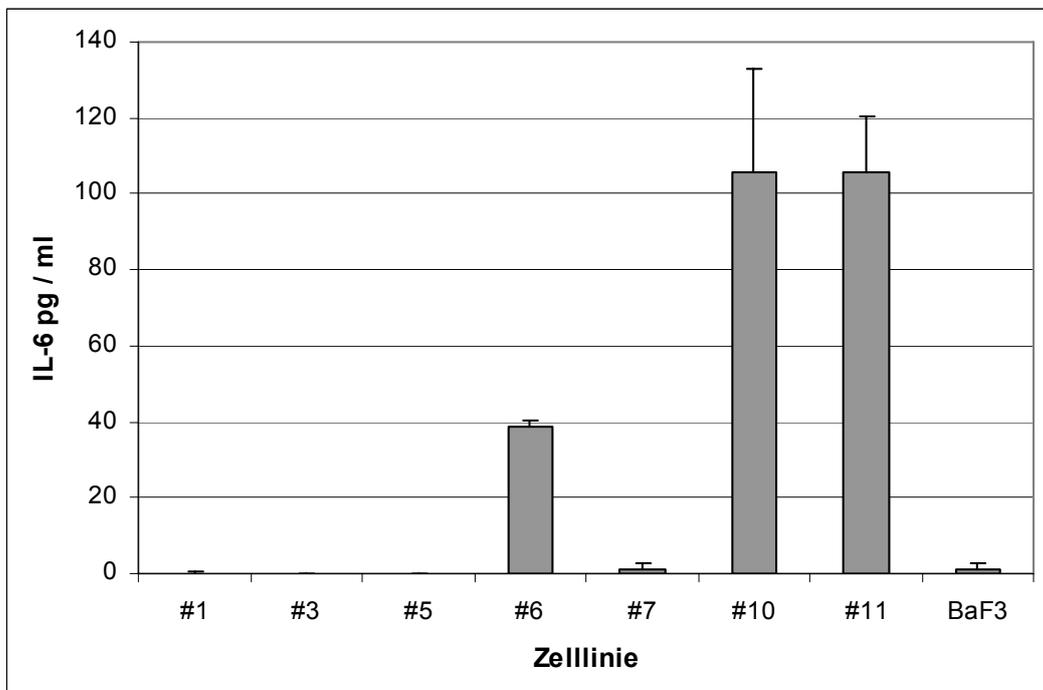


Abb. 3.15: IL-6-Konzentration im Medium von BaF3-Klonen und der parentalen Zelllinie. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten und Standardabweichung.

Parentale BaF3-Zellen und Klone mit Leervektor (#1, 3, 5) sekretierten kein bzw. nur sehr wenig IL-6. Die IL-6-Sekretion der *ETV6/RUNX1*-positiven Klone (#6, 10, 11) betrug dagegen 40 – 100 pg / ml. TA#7 verhielt sich wie die LV-Klone, da sich im Laufe der Zellkultur der Klon verändert hatte und die TA-Expression herunterreguliert worden war.

3.2.8. Proteomanalyse

Die Proteinexpression in BaF3-Klonen wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie untersucht (2.6). Bei der optischen Auswertung der 2D-Gele wurden 23 potenzielle differenziell exprimierte Proteinspots identifiziert, wovon in BaF3-TO/TA-Klonen 16 hochreguliert und sieben herunterreguliert waren.

Die Quantifizierung der Spots ergab, dass sechs von 16 hochregulierten Proteinen und eines von sieben herunterregulierten Proteinen ein Expressionsverhältnis (TA : LV) > 2 bzw. $< 0,5$ aufwiesen und somit differenziell exprimiert waren (Abb. 3.16). Eine Abbildung dieser Spots befindet sich im Anhang (7.4).

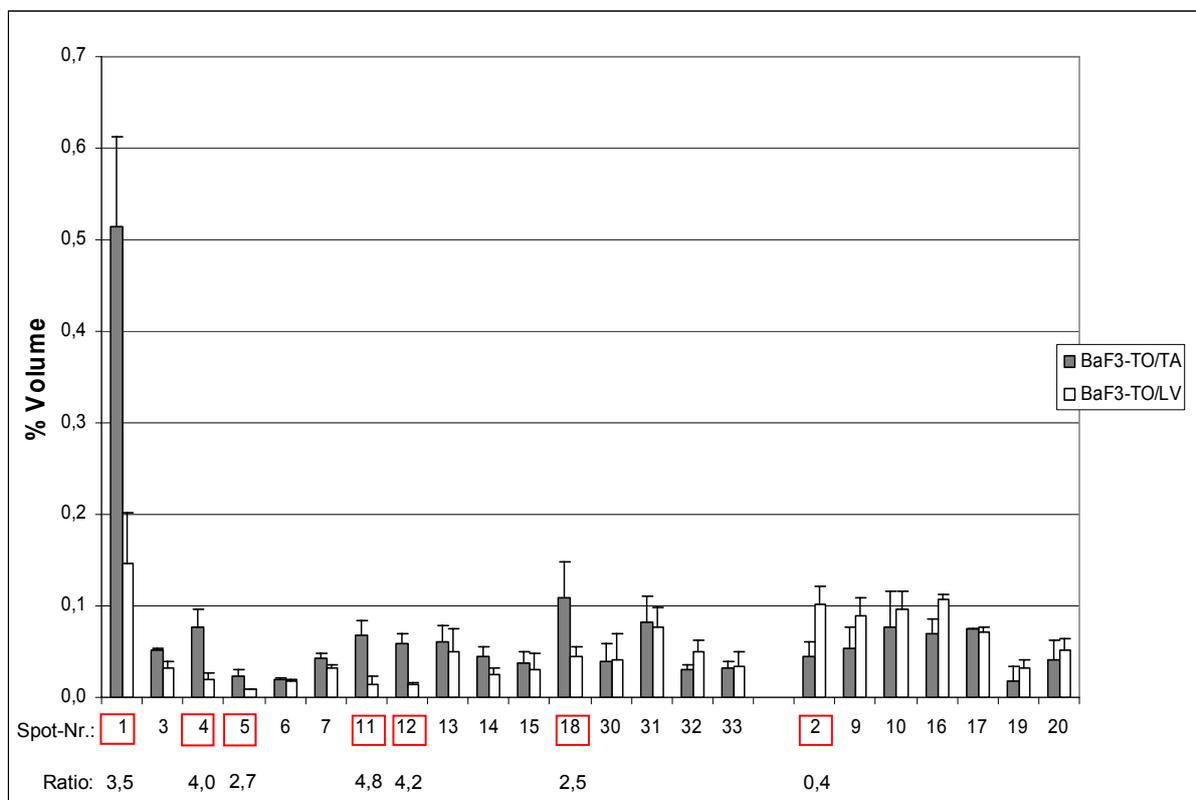


Abb. 3.16: 2D-Gelelektrophorese der BaF3-Klone. Die bei der optischen Auswertung identifizierten Proteinspots wurden quantifiziert. Spots mit umrandeten Nummern sind differenziell exprimiert. Die BaF3-TO/TA-Klone (#6, 7, 10) und die Leervektor-Klone (#1, 3, 5) wurden zusammengefasst. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

In der massenspektrometrischen Analyse (2.6.3) wurde Proteinspot Nr. 1 als SerpinB1a identifiziert. Weitere Proteine konnten nicht identifiziert werden.

3.3. Funktionelle Untersuchung hinsichtlich ausgewählter differenziell exprimierter Gene

3.3.1. Stimulation der IL-6-Sekretion der BaF3-Klone mit $TNF\alpha$

Die IL-6-Expression wird in Tumorzellen u.a. von $TNF\alpha$ reguliert.[177] $TNF\alpha$ wird beispielsweise von tumorassoziierten Makrophagen (TAM) sekretiert. Die erhöhte Ausschüttung von IL-6 stellt eine Regulation der Tumorsuppression durch die Tumorzelle dar.

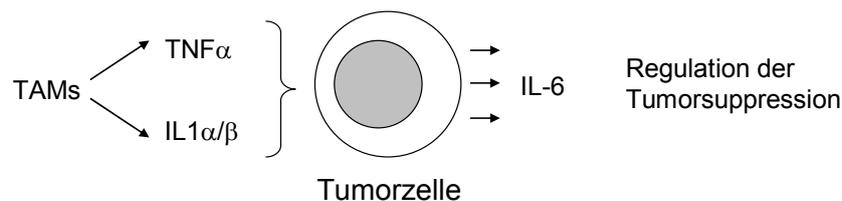


Abb. 3.17: Regulation der Tumorsuppression: Die Tumorzelle wirkt der Tumorsuppression durch Sekretion von IL-6 entgegen. TAMs: tumor-assoziierte Makrophagen

Bei Stimulation mit $TNF\alpha$ stieg die IL-6-Sekretion bei parentalen BaF3-Zellen um 25 pg / ml, bei BaF3-TO/LV-Klonen um bis zu 12 pg / ml und bei BaF3-TO/TA-Klonen um 50 – 90 pg / ml (ausgenommen #7, s. 3.3.1 und Abb. 3.15). Der Anstieg der IL-6-Sekretion war in den *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen mit $p \leq 0,01$ signifikant höher als in den Leervektor-Klonen.

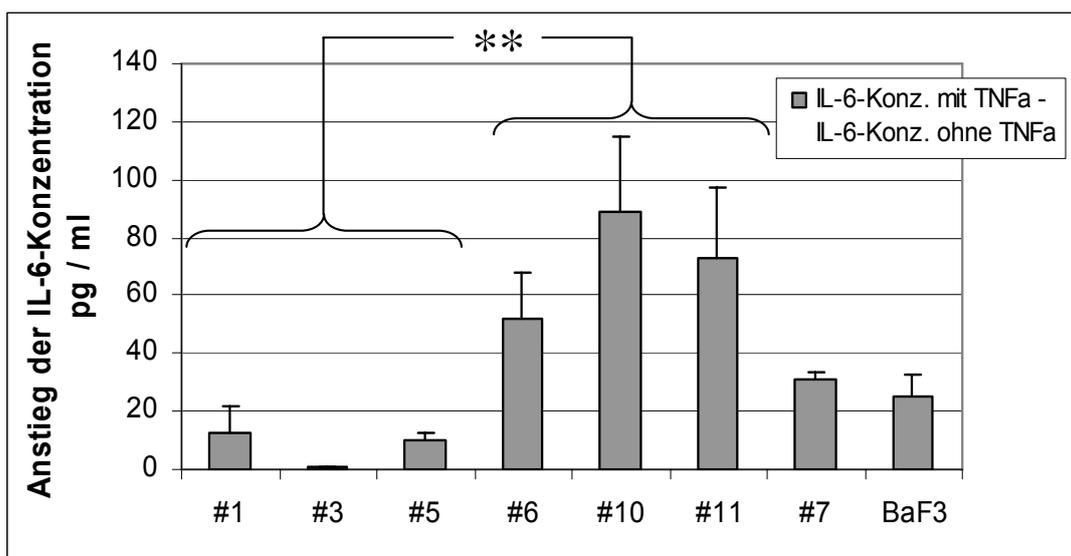


Abb. 3.18: Steigerung der IL-6-Sekretion nach Stimulation der BaF3-Klone und der parentalen Zelllinie mit $TNF\alpha$. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwerten und Standardabweichung.

3.3.2. SerpinB1a-vermittelte Zytoprotektivität gegen TNF α

In einem Zytotoxizitätsassay (2.4.1) wurde getestet, ob die Expression von *SerpinB1a* BaF3-TO/TA-Klone gegen TNF α -induzierte Zytotoxizität schützt.

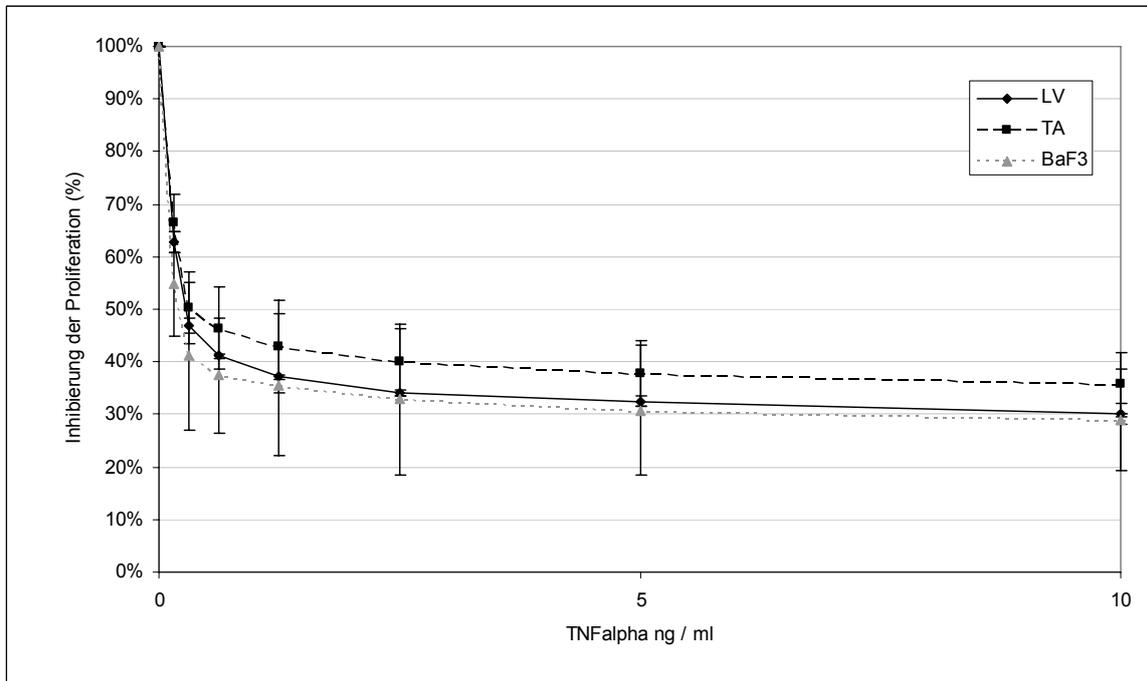


Abb. 3.19: TNF α -induzierte Inhibierung der Proliferation bei BaF3-Klonen. Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils drei BaF3-TO/TA-Klonen, drei BaF3-TO/LV-Klonen und parental BaF3-Zellen aus drei unabhängigen Messungen.

Die Proliferation wurde sowohl in BaF3-TO/LV als auch in BaF3-TO/TA-Klonen durch TNF α inhibiert. Die Inhibierung der Proliferation war in *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen zwar etwas geringer als in den Leervektor-Klonen, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Expression von *SerpinB1a* vermittelte somit keine Zytoprotektivität gegen TNF α in BaF3-Zellen.

4. Diskussion

Die Translokation t(12;21) ist die häufigste rekurrente Translokation bei ALL im Kindesalter und resultiert in der Fusion der Transkriptionsfaktorgene *ETV6* und *RUNX1* sowie der Expression des chimären Proteins ETV6/RUNX1. Das Ziel der Arbeit war, durch genomweite Genexpressionsanalysen diejenigen Gene zu identifizieren, die von ETV6/RUNX1 beeinflusst werden, um dysregulierte Proteine oder Signalwege und somit potenzielle pathogenetische Mechanismen aufzudecken, die zu einem leukämischen Zustand beitragen. Dazu wurde anhand eines zellulären Systems mit stabiler *ETV6/RUNX1*-Expression die Auswirkung des Fusionsgens in genomweiten Genexpressionsanalysen, sowie in zellbiologischen Assays untersucht.

4.1. Etablierung eines zellulären Systems mit stabiler *ETV6/RUNX1*-Expression

4.1.1. Retroviraler Gentransfer

Im ersten Schritt wurde ein zelluläres System mit stabiler Expression des Fusionsgens etabliert.

Eine Herausforderung bei der Etablierung des zellulären Systems stellte der Gentransfer dar. Hämatopoetische Zelllinien sind im allgemeinen resistent gegen Transfektionsmittel oder weisen sehr geringe Transfektionsraten auf, die für nachfolgende Versuche nicht ausreichen.[178] Die Selektion stabiler Zellen ist aber nur bei hohen Transfektionsraten praktikabel, da es lediglich bei einem von 10000 Transfektionsereignissen zu einer stabilen Integration des Vektors ins Genom kommt [179], Suspensionszellen aber hohe Zelldichten ($\sim 10^6$ Zellen / ml) in Kultur benötigen (2.3.1). In stabilen Transfektionsexperimenten stellt dieses dichteabhängige Wachstum einen limitierenden Faktor dar, da die Dichte durch die Marker-Selektion unter einen kritischen Wert fallen kann, der das Auswachsen stabiler Klone verhindert.[180]

Als alternative Methode wurde daher der retrovirale Gentransfer angewendet. Die Vorteile von viralen Expressionssystemen sind eine hohe Transfektionseffizienz der virenproduzierenden Verpackungszellen (meist bis zu 100%), die selbständige Integration der Retroviren in das Wirtsgenom und die meist hohe Expressionsrate des Transgens. Für den Gentransfer wurde ein Vektor verwendet, der auf dem

Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) basiert, einem Onkoretrovirus, der mitotisch aktive Zellen effizient infiziert.

Mittels verschiedener Infektionsstrategien wurden die beiden Vektoren des retroviralen TetON-Systems sukzessiv in BaF3-Zellen eingebracht. Viren, die mit GP2-293-Zellen verpackt wurden, infizierten HEK- und BaF3-Zellen effizienter als Viren, die mit PT67-Verpackungszellen generiert wurden. Die besten Infektionsraten wurden mit konzentriertem Virenüberstand erzielt. Mit dieser Methode wurden auch RO-Zellen effizient infiziert, einzig die TMM-Zelllinie wies keine nennenswerte Infektion auf.

Der Wirtsbereich (Tropismus) des verpackten Virus wird vom Hüllprotein bestimmt. Die Infektion einer Zelle mit einem viralen Partikel wird durch die spezifische Wechselwirkung zwischen dem viralen Hüllprotein mit den als viralen Rezeptoren fungierenden Oberflächenmolekülen der Zelle initiiert. Das von den PT67-Verpackungszellen exprimierte Hüllprotein 10A1 interagiert mit den Phosphattransportern Pit-1 und Pit-2.[181] Die Viren sind in der Lage, ein breites Spektrum an Säugerzellen, auch murine und humane, zu infizieren. Pit-1 wird auf unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert.[182] Eine Transduktion der B-Vorläuferzelllinien BaF3, TMM und RO hätte somit über Pit-1 möglich sein sollen. Pit-2 wird auf reifen hämatopoetischen Zellen zwar stark exprimiert, seine Expression auf Vorläuferzellen ist aber sehr niedrig.[183] BaF3-Zellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich retroviral infiziert.[184-187] Dabei wurden ecotrope und amphotrope Viren verwendet. Ecotrope Viren interagieren mit dem Rezeptor mCAT-1, der auf der Oberfläche muriner und Rattenzellen exprimiert wird, amphotrope Viren mit Pit-2. BaF3-Zellen exprimieren demnach für die Transduktion auch ausreichend Pit-2-Rezeptoren. Das G-Protein des Rhabdovirus „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV-G) kann ebenfalls verwendet werden, um onkoretrovirale Vektorpartikel zu verpacken (Pseudotypisierung).[188] VSV-G bindet an Phospholipide, die ubiquitär in den Zellmembranen vorkommen, und vermittelt somit ein sehr breites Wirtsspektrum (Säuger- und Nicht-Säugerzellen).

Entscheidend für eine effiziente Infektion sind jedoch nicht nur der geeignete Vektortyp und Tropismus, sondern auch eine ausreichende Anzahl an viralen Partikeln. Für die Infektion ist eine MOI (*multiplicity of infection*) von 1 – 3 CFU / Zelle ideal. Stabile virenproduzierende PT67 wiesen einem Titer von 5×10^3 CFU / ml auf. (3.1.3). Für die Infektion der hämatopoetischen Zelllinien wurden 2×10^6 Zellen und

1 ml Virensuspension eingesetzt. Somit betrug die MOI 0,0025 CFU / Zelle und die maximale Transduktionsrate 0,25% der Zellen, was viel zu gering war, um stabile Suspensionszellen selektieren zu können. GP2-293 weisen laut Hersteller einen Titer $\geq 10^6$ CFU / ml auf. Die höhere Infektionsrate mit GP2-293 produzierten Viren gegenüber PT67-verpackten Viren kann demnach auf einem höheren Titer, aber auch dem Rezeptor-unabhängigen Infektionsmechanismus beruhen. Korrelierend mit einer höheren Transfektionsrate der Verpackungszellen und somit höherem Titer, wurde eine steigende Infektionsrate beobachtet (Tab. 3.3). Insgesamt waren die Infektionsraten jedoch geringer als erwartet. HEK-Zellen sind leicht infizierbar und hätten bei der sehr guten Transfektionsrate der GP2-293 von 95% im ersten Versuch (Tab. 3.3) und den verwendeten Infektionsbedingungen (MOI ~ 2 CFU / ml) eine Infektionsrate bis zu 100% aufweisen sollen. Daraus läßt sich schließen, dass entweder die Virenproduktion nicht effizient war oder nicht-funktionale Viren produziert wurden.

Ist der Titer zu niedrig, können die Viren vor der Infektion angereichert werden. Die Bindung der Viren an Retronectin ermöglicht es, diese anzureichern und fördert zusätzlich den Kontakt zwischen Virus und Zielzelle, da auch die Zielzellen über Oberflächerezeptoren mit verschiedenen Domänen des Retronectins interagieren. Auf diese Weise war es möglich, die Vektoren des retroviralen TetON-Systems stabil in BaF3-Zellen einzubringen.

Viren, die mit dem sehr stabilen VSV-G-Protein verpackt sind, können ultrazentrifugiert werden. Einfacher und schonender ist jedoch das Konzentrieren der Viren mittels Amicon-Zentrifugationsröhrchen, wobei das Volumen der Virensuspension unter Zurückhaltung der Viren eingeengt wird. Eine 32-fache Konzentrierung der Virensuspension resultierte bei HEK-Zellen in einer Steigerung der Infektionsrate auf 41%. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Transfektionseffizienzen der GP2-293-Verpackungszellen oftmals sehr gering waren und nur etwa 10% betragen. Diese suboptimalen Transfektionsergebnisse ließen sich weder auf die DNA-Präparation, noch auf das Transfektionsmittel oder die Passagennummer der Zellen zurückführen. Durch das Konzentrieren der Viren mit Amicon-Zentrifugationsröhrchen wurden auch bei BaF3- und RO-Zellen Infektionsraten um 20% erzielt (Tab. 3.5). Ketteler et al. erreichten bei der Infektion von BaF3-Zellen mit ecotropen MoMLV-basierten Viren mit einer MOI von 4 CFU / Zelle ebenfalls Infektionsraten von 20%.^[185] Möglicherweise hätte eine Behandlung der

TMM-Zellen mit Zytokinen oder aber PMA oder die Kultur in phosphatfreiem Medium den retroviralen Gentransfer in diese Zelllinie ermöglicht, da hierdurch die Expression der Pit-1 & Pit-2-Rezeptoren in hämatopoetischen Zelllinien induziert und damit auch die Infektionsrate gesteigert werden kann.[189, 190] Es war nicht möglich, RO-Zellen mit stabil integriertem Tet-System zu etablieren, da diese Zelllinie zu empfindlich auf exogenen Stress reagierte.

Kustikova et al. zeigten, dass die Anzahl der ins Genom integrierten Viren exponentiell mit der Transduktionseffizienz von leukämischen K562-Zellen und primären CD34-positiven hämatopoetischen Zellen ansteigt. Sie detektierten durchschnittlich eine Vektorinsertion pro transduzierter Zelle, wenn die Gentransferrate unter 30% lag, drei Insertionen bei 60 % und neun bei 90%.[191] Die Insertion retroviraler Vektoren ins Genom erfolgt zufällig und kann sowohl zur Inaktivierung, als auch zur Aktivierung von Genen, insbesondere auch von Tumorsuppressor- und Onkogenen, führen. Eine geringe Kopienzahl war somit besonders für die Untersuchung des Effekts von ETV6/RUNX1 auf die Zelle wichtig. Aufgrund der geringen Infektionsraten der BaF3-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass die zur Untersuchung verwendeten Zellen wenige, wahrscheinlich nur eine Viruskopie, integriert hatten.

4.1.2. Genetische Veränderung der Vektorsequenz und die Isolierung einzelner BaF3-Klone

Ein gravierendes Problem beim retroviralen Gentransfer stellte die genetische Veränderung der Vektorsequenz dar (Abb. 3.1). Hohe Rekombinationsraten sind für viele Retroviren beobachtet worden.[192] Der Grund dafür ist, daß Retroviren ein diploides Genom besitzen, also zwei Kopien der viralen RNA verpacken. Während der reversen Transkription kommt es durch Wechseln des RNA-Stranges häufig zur Rekombination. Allerdings liegen die in Retroviren beobachteten Raten für homologe Rekombination deutlich unter der hier beobachteten Mutationshäufigkeit. McIvor et al. beschrieben wiederholt auftretende Deletionen in einem rekombinanten MoMLV-basierten Virus.[193] Sie klonierten die provirale Sequenz zur genaueren Analyse der Deletionen und stellten fest, dass diese vermutlich durch RNA-Spleißen während der Virusreplikation entstanden. Sequenzen des viralen Vektors, die mit Konsensus-Spleißdonor- und -Spleißakzeptor-Sequenzen übereinstimmten, bildeten die Deletionsgrenzen. Eine kryptische Spleißdonor-Sequenz befand sich in der viralen

Sequenz, die anderen Spleißsignale lagen in heterologen Sequenzabschnitten des Vektors. Welcher Mechanismus den in dieser Arbeit beobachteten Mutationen zugrundeliegt, wurde nicht genauer untersucht. Es traten Deletionen und Insertionen auf, z.T. auch innerhalb eines Provirus (Abb. 3.1). Es ist nicht auszuschließen, daß die genetischen Veränderungen schon in den Verpackungszellen oder den Viren auftraten. Die detaillierte Analyse der Mutationen in der Promotorregion der BaF3-TO/TA-Klone (von PT67) (Abb. 3.2) legt jedoch zumindest für die in diesem Bereich fokussiert auftretenden Deletionen homologe Rekombination als Mechanismus nahe. Das TRE (*tetracycline-response element*) im minimalen Promotor setzt sich aus sieben Wiederholungen einer 42 bp langen Sequenz zusammen: die 19 bp lange bakterielle Sequenz des Tet-Operons *tetO* getrennt durch Spacer-Sequenzen. Diese Sequenzwiederholung bildet die Grundlage homologer Rekombination und tatsächlich wiesen alle unterschiedlichen Deletionen direkt stromaufwärts der 5'- und 3'-Grenzen dieselbe Sequenz auf (Abb. 3.2). Dabei war nicht die heterologe *ETV6/RUNX1*-Sequenz Auslöser der Mutation, da Deletionen auch im Promotorbereich des Leervektors pLP-RevTRE auftraten (Abb. 3.3). Marzio et al. beschrieben die Veränderung des TRE im Promotor eines HIV. Um einen HIV mit doxyzyklin-abhängiger Replikation zu generieren, fügten sie 8 *tetO* in den LTR des Virus ein. Während der Passage des Virus über die Dauer von 46 Tagen durchlebte der LTR-Promotor ein drastisches Rearrangement in Form einer schnellen Verkürzung der 8 originalen *tetO*-Elemente zu drei oder zwei Bindungsstellen.[194] Da diese TRE-Verkürzung in allen Kulturen beobachtet wurde, vermuten Marzio et al., dass sie dem Virus einen grundlegenden Replikationsvorteil verschafft und somit eine Evolution des Virus darstellt. Da in dieser Arbeit replikationsdefiziente Viren verwendet wurden, ist Selektionsdruck keine Ursache für den hohen Anteil von Klonen mit mutierter Sequenz. Allerdings zeigen die Beobachtung von Marzio et al. und die Beobachtungen aus dieser Arbeit, dass das TRE bei Verwendung in Viren eine bevorzugte Region für Mutationen darstellt. Bei der Weiterentwicklung des minimalen CMV-Promotors des Tet-Systems verwendeten Loew et al. deshalb zufällige Spacer-Sequenzen, um die Sequenzgleichheit zu reduzieren.[195]

Es ist unklar, weshalb die Mutationsrate in BaF3-Klonen, die mit PT67-generierten Viren infiziert worden waren, höher war als in BaF3-Klonen von GP2-293-Viren. Da auch bei letzteren etwa 50% der Klone Mutationen aufwiesen, wird deutlich, wie wichtig die Etablierung monoklonaler, transgener BaF3-Zelllinien für die weiteren

Versuche war. Mit der Methode von Brielmeier et al. wurden einzelne BaF3-Klone mittels limitierter Verdünnung effizient isoliert. Der Zusatz von Antioxidantien zum Medium schützt Zellen vor oxidativem Stress, dem sie bei Kultur mit niedriger Zelldichte ausgesetzt sind.[180]

4.1.3. Funktionalität des TetON-Systems

Für Experimente, bei denen die Expression des Transgens toxische oder andere negative Effekte auf die Zelle oder die Entwicklung eines Organismus nach sich zieht, ist die Regulation der Expression notwendig. Für die temporär regulierte Transgenexpression stehen eine Reihe von regulatorischen Systemen zur Verfügung, mit denen die Expression an- und abgeschaltet sowie die Expressionstärke reguliert werden kann. Am weitesten verbreitet ist das Tet-System, das auf dem prokaryotischen Tetrazyklin-Repressor TetR fusioniert mit einer Transaktivierungsdomäne (TA) basiert und das auch in dieser Arbeit verwendet wurde.[196] Ein elementarer Bestandteil des Tet-System ist außerdem der minimale Promotor. Durch die PCR-Analyse der Promotorregion wurden BaF3-Klone identifiziert, die die gesamte Promotorsequenz aufwiesen. Somit wurde eine Fehlregulation der *ETV6/RUNX1*-Expression aufgrund defekter Promotorsequenz ausgeschlossen. Das Ziel bei der Etablierung eines Tet-Systems sind eine geringe Basalexpression (Expression im abgeschalteten Zustand) sowie eine starke Expression im angeschalteten Zustand, welche zusammen in einer hohen Induzierbarkeit resultieren. Beim TetON-System, das den reversen Transaktivator rtTA verwendet, erfolgt durch Zugabe von Doxyzyklin die Induktion der Expression.[197] Die RT-PCR-Analyse der etablierten BaF3-TO/TA-Klone nach Kultur mit oder ohne Doxyzyklin zeigte jedoch die konstitutive Expression von *ETV6/RUNX1* in diesen vier Klonen (Abb. 3.5). Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich. Je nach Integrationsort können Positionseffekte (z.B. die Nähe eines endogenen Promotors oder regulatorischen Elements, epigenetische Effekte) den induzierbaren Promotor beeinflussen, so dass das Transgen gar nicht oder konstitutiv exprimiert wird oder die Induzierbarkeit des minimalen Promotors beeinträchtigt ist. Gerade γ -Retroviren, zu denen auch das MoMLV gehört, integrieren bevorzugt in promotornahe Regionen.[198] Häufig erfordert die Etablierung optimal regulierter Klone das Screening vieler Klone und ist deshalb zeitaufwändig und teuer. Um diesem Problem zu begegnen, wurden beispielsweise

Vektoren mit ko-exprimierten oder bidirektional exprimierten Markern entwickelt.[199, 200] Z.B. ermöglicht die Verwendung von EGFP als Marker die einfache durchflußzytometrische Isolierung von Zellen mit den gewünschten Charakteristika im Anschluß an den Gentransfer, wodurch auch die Isolierung von Klonen überflüssig wird. Mit der "Screen and Insert"-Methode, bei der die Insertion des Tet-Systems an spezifische, prä-charakterisierte chromosomale Lozi erfolgt, verfolgen Brough et al. die Strategie, Positionseffekte im voraus auszuschließen.[201] Die Etablierung episomaler Vektoren, die die Elemente des Tet-System tragen, ermöglicht stabilen Gentransfer ohne genomische Integration und evtl. daraus resultierenden Positionseffekten.[200, 202]

Neben chromosomalen Positionseffekten können auch in den Vektor eingebrachte Sequenzen regulatorische Elemente enthalten, die als Enhancer fungieren. Weiterhin kann die intrinsische Aktivität des minimalen Promotors in verschiedenen Zelllinien variieren. Ursache hierfür können versteckte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im minimalen Promotor sein. Rang et al. identifizierten beispielsweise funktionale ISR-Elemente im minimalen Promotor, die das Ansprechen bei Stimulation mit Interferon regulieren.[203] Im TetON-System weist der reverse Transaktivator rtTA eine Restaffinität zur Sequenz des Tet-Operons *tetO* auf, die teilweise als niedrige, intrinsische Basal-Aktivität beobachtet werden kann.[204] Manipulationen des reversen Tet-Repressors sowie des cis-agierenden, induzierbaren Promotors, aber auch die Kombination Doxyzyklin-regulierter Aktivierung und Repression, waren wichtige Weiterentwicklungen, die in einer verbesserten Regulierbarkeit der konditionellen Expression resultierten.[195, 204, 205].

Klucher et al. verwendeten BaF3-Zellen zur Etablierung eines zellulären Systems mit konditioneller Expression des Onkogens *BCR/ABL*. [206] Die Elemente des TetON-Systems wurden mittels Elektroporation sukzessiv in BaF3-Zellen eingebracht und stabile Klone isoliert. In ihrer Publikation beschreiben Klucher et al. die Etablierung eines Klons, der die gewünschte Regulierbarkeit der *BCR/ABL*-Expression aufweist. Während der Etablierung der Zelllinie beobachteten sie bei verschiedenen Klonen eine hohe Variabilität der Basal-Expression, sowie der Expression im induzierten Zustand, wie sie an anderer Stelle beschreiben.[207] Es ist also durchaus möglich, ein funktionales TetON-System in BaF3-Zellen zu etablieren, allerdings nur mit dem nötigen Screening-Aufwand. Da das Screening in Kombination mit der hohen

Mutationsrate des experimentellen Vektors des TetON-Systems als wenig erfolgversprechend erschien, wurde in dieser Arbeit auf die Induzierbarkeit der *ETV6/RUNX1*-Expression verzichtet.

4.1.4. Validierung der *ETV6/RUNX1*-Expression in den etablierten BaF3-Klonen

Für die Untersuchung des Effekts der Expression von *ETV6/RUNX1* in hämatopoetischen Vorläuferzellen waren somit vier BaF3-Klone mit konstitutiver Expression des Transgens und drei Leervektor-Klone etabliert worden. Alle Klone wiesen eine intakte Promotorregion auf. Eine Mutation des Transgens wurden durch Sequenzierung der *ETV6/RUNX1*-Sequenz ausgeschlossen. Lediglich bei BaF3-TO/TA-Klon 7 fand ein Basenaustausch statt. Dabei handelte es sich jedoch um eine stille Mutation ohne Auswirkung auf die Peptidsequenz des Proteins (3.1.5.2). Die BaF3-TO/TA-Klone wiesen drei- bis neunmal höhere *ETV6/RUNX1*-mRNA-Level auf, als REH-Zellen (Abb. 3.6). Die REH-Zelllinie basiert auf dem peripheren Blut einer ALL-Patientin und ist die einzige etablierte Zelllinie, die die Translokation t(12;21) aufweist und das assoziierte Fusionsgen *ETV6/RUNX1* exprimiert. Aufgrund der hohen Basal-Aktivität des minimalen Promotors war keine nennenswerte Induktion der *ETV6/RUNX1*-Expression in den BaF3-TO/TA-Klonen nach Stimulation mit Doxyzyklin zu beobachten. Bei Klon 10 führte die Zugabe von Doxyzyklin sogar zu einer Abnahme der mRNA. Ein gut funktionierendes Tet-System ermöglicht eine Induktion der Genexpression um mehrere Größenordnungen.

Im Western Blot wurde die Expression des vollständigen Fusionsproteins in BaF3-Zellen nachgewiesen. Mit der Proteinextraktionsmethode von Poirel et al. wurden zwei *ETV6/RUNX1*-Spezies um 100 kDa nachgewiesen (Abb. 3.7). In REH-Zellen wurden drei Proteinspezies um 100 kDa detektiert. Dies entspricht den Ergebnissen von Poirel et al., die drei *ETV6/RUNX1*-Formen von 90, 96 und 106 kDa Größe in REH-Zellen und sogar drei bis fünf Banden in Patientenproben beobachteten.[169] Da sowohl *RUNX1* als auch *ETV6* aufgrund alternativen Spleißens bzw. alternativer Translationsstarts und post-translationaler Modifikationen als multiple Proteinspezies vorliegen, ist die Detektion mehrere *ETV6/RUNX1*-Banden nicht überraschend. Die bei den BaF3-TO/TA-Klonen auf mRNA-Ebene gemessenen Expressionsunterschiede mit und ohne Doxyzyklin-Stimulation konnten auf Proteinebene nicht beobachtet werden. Hier wiesen alle vier *ETV6/RUNX1*-positiven Klone im nicht-

induzierten Zustand eine höhere Expression des Transgens auf. Aufgrund zellulärer Mechanismen, z.B. post-transkriptioneller und post-translationaler Modifikation, sowie unterschiedlicher Proteinstabilität, besteht nicht immer eine direkte Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel. Ein methodischer Fehler ist unwahrscheinlich, da von jedem NP40-Extrakt die gleiche Menge Protein für den Western Blot eingesetzt und die Proteinbestimmung für alle Proben gemeinsam durchgeführt wurde.

Bei BaF3-TO/TA-Klon 7 wurde über die Dauer der Kultur eine Veränderung beobachtet. Der Klon wies zunehmend die Charakteristika eines Leervektor-Klons auf. Die erneute Quantifizierung der *ETV6/RUNX1*-Expression zeigte, dass diese in Klon 7 deutlich abgenommen hatte. Transkriptionelles Silencing ist ein häufig auftretendes Problem bei retroviralem Gentransfer, besonders wenn MoMLV-basierte Vektoren verwendet werden. Das Silencing des Provirus wird auf zelluläre Mechanismen der Genrepression, wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikation, aber auch auf retrovirale Sequenzen, die als Silencer agieren können, zurückgeführt.[208]

4.2. Effekt der *ETV6/RUNX1*-Expression in BaF3-Zellen

Anhand des etablierten zellulären Modells sollte die Auswirkung der *ETV6/RUNX1*-Expression auf zellbiologischer Ebene sowie auf Genexpressionsebene untersucht werden.

4.2.1. Auswirkung der Expression des Fusionsgens auf zellbiologischer Ebene

Protoonkogene, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren, beeinflussen auf verschiedene Art und Weise den Zellzyklus und das Zellwachstum. Tumorsuppressorgene überwachen den Zellzyklus und die DNA. Genetische Veränderungen können durch die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Transformation der Zelle führen, die sich folglich in einer aberranten Proliferation oder Apoptose oder einer Veränderung des Zellzyklus äußern kann. Als zellbiologische Parameter wurden deshalb die Proliferation, die Apoptose und der Zellzyklus untersucht.

Die Expression von *ETV6/RUNX1* zeigte keinen Effekt auf die Proliferation und die Apoptose in BaF3-Zellen und vermittelte kein IL-3-unabhängiges Wachstum der

BaF3-TO/TA-Klone. Sie führte zu einer sehr leichten, jedoch signifikanten Verzögerung des Übergangs von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Abb. 3.11). RUNX1 induziert über die Regulation von Zellzyklusgenen bzw. -proteinen den Eintritt der Zelle in die S-Phase und wird selbst während des Zellzyklus auf Proteinebene reguliert.[125] Die Expression der Fusionsonkogene *CBF β -SMMHC* und *RUNX1/MTG8* verzögert dagegen die Progression von der G1- in die S-Phase in BaF3-Zellen. Diese Inhibition des Zellzyklus ist auf die Repression der RUNX1-Transaktivierung durch die Fusionsproteine zurückzuführen.[209] *CBF β -SMMHC* reduziert die Bindung von RUNX1 an die DNA, während *RUNX1/MTG8*, wie *ETV6/RUNX1*, als dominant negativer Repressor der RUNX1-Transaktivierung wirkt. Die Expression eines Fusionsproteins aus der RUNX1-DNA-Bindungsdomäne und der KRAB-Transrepressionsdomäne resultierte ebenfalls in einem Arrest von BaF3-Zellen in der G1-Phase.[149] Umgekehrt wurde durch gleichzeitige, exogene Expression von *RUNX1* in BaF3-Zellen die durch *CBF β -SMMHC* induzierte Blockade der Zellzyklus-Progression und damit die Inhibition der Proliferation aufgehoben. Die Expression von *CBF β -SMMHC* in BaF3-Zellen resultierte in einer bis zu zehnfachen Abnahme der Proliferation in BaF3-Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden.[124, 210] Die Expression von *ETV6/RUNX1* in BaF3-Zellen führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Proliferation zwischen Klonen mit Transgen und Leervektor-Klonen innerhalb von 72 Stunden (Abb. 3.8), da der beobachtete Effekt von *ETV6/RUNX1* auf den Zellzyklus vermutlich sehr gering ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich solch ein Unterschied über einen längeren Beobachtungszeitraum manifestiert hätte.

Eine Eigenschaft transformierter Zellen ist ihre reduzierte Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren bzw. ihre Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren. Aufgrund ihres IL-3-abhängigen Wachstums stellen BaF3-Zellen somit ein geeignetes System dar, um das transformierende Potenzial tumorassoziierter Gene *in vitro* zu untersuchen. Für eine Reihe Leukämie-assoziiierter Fusionsgene (u.a. *BCR/ABL*, *ETV6/ARG* und *E2A/HLF*) wurde gezeigt, dass ihre Expression in BaF3-Zellen IL-3-unabhängiges Wachstum vermittelt.[206, 211] *BCR/ABL* und *ETV6/ARG* sind potente Fusionsonkogene, die auch *in vivo* zur Ausbildung von Leukämien in Mäusen führen. Beiden Fusionsproteinen liegt die konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne als Pathomechanismus zugrunde. *E2A/HLF* ist ein mit pädiatrischer ALL assoziierter, chimärer Transkriptionsfaktor. Seine alleinige

Expression induziert keine Leukämie in Mäusen, hierfür sind kooperierende genetische Veränderungen notwendig.[212] Die Expression von *CBF β -SMMHC* vermittelt dagegen kein IL-3-unabhängiges Wachstum in BaF3-Zellen und verlangsamt auch nicht die Apoptose der Zellen nach Entzug von IL-3.[213]

Auch die Expression von *ETV6/RUNX1* vermittelte kein IL-3-unabhängiges Wachstum in BaF3-Zellen (Abb. 3.9). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Andreasson et al. überein, die zeigten, dass die Expression von *ETV6/RUNX1* keine Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit in murinen IL-3-abhängigen BaF3- und 32Dcl.3-Zellen sowie IL-7-abhängigen IxN/2b-Zellen vermittelt.[214] In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch die regelmässige Messung der Proliferation der Klone nach IL-3-Entzug gezeigt, dass die *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen sogar sensibler auf den Stress reagierten: 48 und 72 Stunden nach IL-3-Entzug wiesen die BaF3-TO/TA-Klone ein signifikant geringeres Überleben auf als die Leervektor-Klone.

Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat das transformierende Potenzial von *ETV6/RUNX1* *in vitro* und *in vivo* untersucht.[214-217] Im Mausmodell induziert die Expression von *ETV6/RUNX1* allein keine Leukämien, jedoch ist *ETV6/RUNX1* in der Lage, frühe BVZ zu transformieren und einen prä-leukämischen Phänotyp hervorzurufen.[215, 216] Tsuzuki et al. fanden nach Transplantation *ETV6/RUNX1*-transduzierter hämatopoetischer Stammzellen in syngene Mäuse eine spezifische Störung der B-Zelldifferenzierung, die in einer Akkumulation früher pro-B-Zellen und einer reduzierten Produktion reifer B-Zellen im Knochenmark resultierte.[215] Der im Mausmodell beobachtete Effekt des Fusionsproteins stimmt mit dem Phänotypen t(12;21)-positiver ALL überein. Der Großteil *ETV6/RUNX1*-positiver ALL im Kindesalter weist einen CD19-positiven BVZ-Phänotypen auf. In Übereinstimmung damit wurden von Morrow et al. bei der Expression von *ETV6/RUNX1* in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der fetalen Leber ein erhöhtes Selbsterneuerungspotential von B-Vorläuferzellen beobachtet.[217]

Im Gegensatz zu onkogenen Fusionsgenen, wie z.B. aktivierte Tyrosinkinase, die Signalübertragungswege betreffen, gibt es nur wenige Beispiele aberranter Transkriptionsfaktoren, die *in vivo* Leukämien auslösen.[214] Man geht davon aus, dass aberrante Transkriptionsfaktoren als Master-Gene fungieren, die eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Zielgenen und der Differenzierung

spielen, dass diese Veränderungen jedoch nicht das Überleben oder die Proliferation der Zelle an sich beeinflusst.[214]

Die Expression von *CBF β -SMMHC* vermittelt kein IL-3-unabhängiges Wachstum in BaF3-Zellen, inhibiert jedoch temporär die Apoptose der Zellen infolge der DNA-Schädigung durch Bestrahlung oder Behandlung mit Etoposid, indem es die Induktion von p53 reduziert.[213] In wildtypischen Zellen wird p53 infolge von DNA-Strangbrüchen induziert und führt zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose. Ob die Expression von *ETV6/RUNX1* BaF3-Zellen z.B. vor strahlungsinduzierter Apoptose schützt, wurde nicht untersucht. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die Untersuchung des toxischen Effekts verschiedener Zytostatika auf die leukämischen Blasten von Patienten mit ALL gezeigt hat, dass *ETV6/RUNX1*-positive Blasten sensitiver auf die Topoisomerase-II-Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin reagieren als *ETV6/RUNX1*-negative ALL-Blasten.[159] Ob diese Zytostatikaspezifität durch das Fusionsprotein verursacht wird und welcher Mechanismus in diesem Fall zugrunde liegt, ist unbekannt.

Unter normalen Kulturbedingungen unterschied sich die Rate der Apoptose und Nekrose in Zellen mit oder ohne Transgen nicht (Abb. 3.10). Allerdings weisen BaF3-Zellen an sich eine sehr hohe Vitalität von 90% auf, so dass es schwer ist, anti-apoptotische Effekte unter diesen Bedingungen wahrzunehmen.

4.2.2. Auswirkung der Expression des Fusionsgens auf Genexpressionsebene

Die Translokation t(12;21) führt zur Fusion der Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1. Das chimäre Protein enthält die Oligomerisierungsdomäne von ETV6, sowie die DNA-Bindungsdomäne und die Transaktivierungsdomäne von RUNX1. Im Gegensatz zu RUNX1 wirkt das Fusionsprotein jedoch als dominant-negativer Repressor.[150-152] Es wird angenommen, dass ETV6/RUNX1 über eine Veränderung des Transkriptom direkt zur Transformation der Zelle beiträgt.

Die infolge der *ETV6/RUNX1*-Expression differenziell exprimierten Gene wurden in Genexpressionanalysen mittels Microarray-Technologie ermittelt. Die Überrepräsentationsanalyse sollte Aufschluss darüber geben, ob Genprodukte mit ähnlicher Funktion oder bestimmte Signalwege regulatorisch betroffen sind. Durch die Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen sollte ermittelt werden, ob die

differenziell exprimierten Gene koreguliert werden und welche Gene möglicherweise direkt von ETV6/RUNX1 reguliert werden.

Es wurden 181 Gene identifiziert, die infolge der *ETV6/RUNX1*-Expression in BaF3-Zellen differenziell exprimiert wurden. Davon wurden in den BaF3-TO/TA-Klonen 77 Gene hochreguliert und 104 Gene herunterreguliert (Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass ETV6/RUNX1 als transkriptioneller Repressor agiert. Bekannte RUNX1-Zielgene wie *GM-CSF*, *IL-3*, *CSF1R*, *CR1*, *TCR $\beta/\gamma/\delta$* , *CD11a*, *MDR-1*, *MPO*, *NE*, *GranzymB*, *c-fos*, *M-CSF*, *G-CSF*, *CD34*, *PU.1*, *c-myb*, *NP-3*, *Vav*, *flt-3* und *Osteocalcin* [152] waren nicht darunter.

Gene mit einem Fold Change ≥ 2 (n = 66) wurden einer TFBS-Analyse unterzogen und 56 dieser Gene wurden von dem Programm oPossum in die Analyse integriert. 45% der hochregulierten Gene wiesen in ihrem Promotor potenzielle RUNX1-Bindungsstellen auf (Tab. 3.12). Bei den herunterregulierten Genen waren es sogar 57% (Tab. 3.13). Statistisch waren RUNX1-TFBS in den Promotoren jedoch nicht überrepräsentiert, unabhängig davon, ob die hoch- und herunterregulierten Gene getrennt oder ob alle Gene gemeinsam ausgewertet wurden. Auch andere TFBS waren nicht überrepräsentiert. Eine Koregulation der differenziell exprimierten Gene mit einem Fold Change ≥ 2 ist somit unwahrscheinlich und spricht eher dafür, dass viele der differenziell exprimierten Gene über verschiedene Signalwege sekundär und tertiär reguliert werden. Es ist jedoch möglich, dass eine Koregulation der Gene aufgrund der Stringenz der Analyseparameter und der definierten Größe der untersuchten Promotorregionen nicht erfasst wurde.

Durch die Zuordnung der Probe Sets orthologer Gene war es möglich, die in den BaF3-Klonen 181 differenziell exprimierten Gene mit Genexpressionsdaten aus Untersuchungen von Diagnose- und Rezidivproben von Patienten mit *ETV6/RUNX1*-positiver ALL zu vergleichen. Es zeigte sich, dass die Genexpressionsprofile der *ETV6/RUNX1*-positiven hämatopoetischen Zellen und der leukämischen Blasten von ALL-Patienten keine Ähnlichkeit aufwiesen (Tab. 3.10).

Man geht davon aus, dass die Translokation t(12;21) ein frühes, initiiierendes Ereignis während der Leukämogenese ist. Kooperierende genetische Veränderungen sind zur Ausbildung einer Leukämie notwendig. *ETV6/RUNX1*-positive ALL weisen durchschnittlich mehr als sechs Veränderungen der Kopienzahl (Deletionen, Amplifikationen) auf.[42] Dieses Ergebnis deckt sich mit dem bekannten

Verhalten dieses Leukämie-Subtyps: *ETV6/RUNX1*-positive ALL weisen lange Latenzzeiten vom Auftreten der Translokation *in utero* bis zur Leukämie sowie eine niedrige Konkordanzrate von 10% in Zwillingen auf.[218] Man kann davon ausgehen, dass nachfolgende genetische Veränderungen zu weiteren Fehlregulationen von Genen, Proteinen und Signalwegen führen, die in einer schrittweisen Transformation der Zelle resultieren. Damit einhergehend wird sich auch das Transkriptom der Zelle stufenweise verändern, so dass das Genexpressionsprofil, das eine Zelle mit *ETV6/RUNX1*-Expression auszeichnet, für die leukämischen Zelle nicht mehr charakteristisch ist.

Die Genexpressionsdaten der BaF3-Klone wurden deshalb mit Ergebnissen von Shimada et al. und von Dunne et al verglichen, die Gene identifizierten, deren Expression durch das AML-assoziierte Fusionsprotein *RUNX1/MTG8* beeinflusst wird. Wie bei *ETV6/RUNX1* sind bei *RUNX1/MTG8* kooperierende genetische Veränderungen zur Entwicklung des vollen malignen Phänotyps notwendig. Beide Fusionsproteine wirken als transkriptionelle Repressoren an *RUNX1*-DNA-Bindungsstellen und hemmen in dominant negativer Weise die Transkriptionsaktivierung durch *RUNX1*. Dabei vermitteln beide Fusionsproteine ihre Funktion über die Rekrutierung von Ko-Repressoren und HDACs.[153] Shimada et al. publizierten 24 Gene, die infolge der Expression von *RUNX1/MTG8* in murinen myeloiden Vorläuferzellen (LG-Zellen) differenziell exprimiert wurden. Dunne et al. identifizierten 40 Gen, die nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von *RUNX1/MTG8* in t(8;21)-positiven Kasumi-1-Zellen differenziell exprimiert wurden. Sieben von 24 Genen bzw. fünf von 40 Genen wurden in BaF3-Zellen infolge der Expression von *ETV6/RUNX1* reguliert, wobei die Versuche von Shimada et al. mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen direkter vergleichbar sind, da auch hier das Fusionsgen ektop exprimiert wurde. Interessanterweise wurden zehn der zwölf Gene, die die Schnittmenge bildeten, in gleicher Weise reguliert, darunter auch *SerpinB1a*. Nur zwei Gene wurden in *RUNX1/MTG8*-exprimierenden myeloiden Vorläuferzellen und *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen gegensätzlich reguliert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Validität der in den BaF3-Zellen gewonnenen Genexpressionsdaten.

Um molekulare Signalwege zu identifizieren, welche die *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Zellen charakterisieren, wurden die 181 differenziell exprimierten Gene hinsichtlich ihrer GO-Annotation untersucht. Aus der GO-Kategorie „Biologischer

Prozess“ waren die untergeordneten Kategorien „defense response“ und „response to biotic stimulus“ überrepräsentiert. Mit beiden Kategorien waren 14 hochregulierte Gene assoziiert: *Blnk*, *CD55*, *IL8rb*, *Cblb*, *Nalp10*, *Tnf*, *Apaf1*, *Prkca*, *Slamf1*, *Ifi47*, *Lta*, *Lilrb3*, *IL-6*, *Lat2*. Weiterhin war die GO-Kategorie „basolateral plasma membrane“ (aus der übergeordneten Kategorie „Zellulärer Bestandteil“) durch die fünf hochregulierten Gene *Col17a1*, *Itga4*, *Itga6*, *Slc12a6* und *Bcar1* überrepräsentiert. Kategorien, die sich auf den Zellzyklus beziehen, waren nicht überrepräsentiert und es wurden unter den 181 differenziell exprimierten Genen keine prominenten Zellzyklusgene gefunden. Auch bekannte anti- und proapoptische Gene waren nicht vertreten.

Unter den 181 differenziell exprimierten Genen befand sich eine Reihe von Genen, die mit der Entwicklung hämatopoetischer Zellen assoziiert sind, u.a. *Slamf1*, *CXCR4*, *Sell*, *Lat2*, *Lat*, *Lilrb*, *Blnk*, *Pik3cd*, *BRDG-1* (AI586015), *IL-6*, *IL-8Rb*, sowie die T-Zell-assoziierten Gene *GranzymC*, *Ctla2a*, *Ctla2b* und *Cblb*.

Der Oberflächenrezeptor Slamf1 (CD150) gilt als Marker für LTR-HSC, da er auf HSC exprimiert wird, während multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen, die kein Selbsterneuerungspotenzial besitzen, Slamf1-negativ sind.[219] Mitglieder der Familie der Slam-Rezeptoren sind Schlüsselregulatoren der Leukozytenaktivierung und Differenzierung.[220]

CXCR4 ist der einzige relevante Chemokinrezeptor, der auf HSC exprimiert wird. Sein Ligand SDF-1 α wird von den Knochenmarkstromazellen gebildet und spielt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese, speziell für das Homing dieser Zellen ins Knochenmark, dem primären Ort der frühen hämatopoetischen Zellentwicklung.[221] SDF-1 α reguliert die Entwicklung insbesondere von B-Zellen und myeloischen Vorläuferzellen durch Retention unreifer hämatopoetischer Zellen im supportiven Knochenmarkmikromilieu, so dass ein vorzeitiges Ausschwemmen dieser Zellen in das periphere Blut verhindert wird.[222]

Das Ausschwemmen unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen ins periphere Blut ist ein Kennzeichen für Leukämien und wird auf eine aberrante Adhäsion der leukämischen Zellen an das Knochenmarkstroma zurückgeführt. L-Selektin (SELL, CD62L) wird auf Leukozyten exprimiert und weist Funktionen bei der Zelladhäsion und der Signalübertragung auf. Wie CXCR4 spielt es eine wichtige Rolle für das Homing hämatopoetischer Vorläuferzellen.[223] Die Expression von L-Selektin ist in Patienten mit CML signifikant geringer als in normalen Kontrollen. Es wurde gezeigt,

dass die Expression von L-Selektin mit der Aktivität des CML-assoziierten Fusionsproteins BCR/ABL korreliert und durch Behandlung mit dem Abl-Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in BCR/ABL-positiven Zelllinien sowie im Knochenmark von CML-Patienten gesteigert werden kann.[224]

Lat2, *Lat*, *Lilrb*, *Blnk*, *Pik3cd* und *BRDG-1* (AI586015) sind mit dem Signalweg des prä-B-Zellrezeptors assoziiert. Die B-Zellentwicklung findet in aufeinander folgenden Stadien statt, die sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker sowie den Rekombinationstatus der Gene für die schwere und die leichte Immunglobulinkette definieren. Die Selektion für die Expression eines funktionalen prä-B-Zellrezeptors ist ein wichtiger Kontrollpunkt in diesem Prozess.[225] Der prä-B-Zellrezeptor überträgt Signale, die die Proliferation und die Differenzierung der pro-B-Zelle zum prä-B-Zellstadium stimulieren. Signale vom prä-B-Zellrezeptor können aber auch die Apoptose der Zelle auslösen, weshalb die Expression eines funktionalen prä-B-Zellrezeptors einen effektiven Mechanismus darstellt, um das Überleben oder die Eliminierung einzelner B-Zellklone zu regulieren. In verschiedenen malignen B-Zellerkrankungen ist die Funktion des prä-B-Zellrezeptors beeinträchtigt. Beispielsweise resultiert die Expression von *BCR/ABL* bei prä-B-ALL in einer konstitutiven Phosphorylierung der Bruton's Tyrosinkinase (BTK). Durch die dysregulierte Aktivierung der BTK werden Überlebensstimuli vermittelt, die sonst durch den prä-B-Zellrezeptor übertragen werden.[226] BLNK und LAT sind zentrale Adaptorproteine, die den aktivierten prä-B-Zellrezeptor mit nachfolgenden Abläufen in prä-B-Zellen verbinden. Auch LAT2 ist ein Adaptorprotein, inhibiert jedoch die Entwicklung von prä-B-Zellen.[225] BRDG-1 agiert als Effektorprotein unmittelbar stromabwärts der Tyrosinkinase Tec.[227]

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, das von verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, normalen hämatopoetischen Zellen, T- und B-Lymphozyten und einigen Tumorzellen, produziert wird. Es spielt eine essenzielle Rolle bei der terminalen Differenzierung von B-Zellen, reguliert die Immunfunktion, Entzündungsreaktionen und die Hämatopoese.[228] Im Knochenmark wird IL-6 hauptsächlich von den Stromazellen gebildet und fördert die Proliferation, das Überleben und die Selbsterneuerung von HSC und frühen HPC, die den IL-6-Rezeptor exprimieren.[229] Verschiedene Studien haben untermauert, dass die Dysregulation der IL-6-Produktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese lymphoproliferativer Erkrankungen spielt. Maligne Lymphomzellen weisen keine

normalen Regulationsmechanismen auf und sekretieren ununterbrochen IL-6. Über autokrine und parakrine Mechanismen fördert sekretiertes IL-6 das Wachstum der Tumorzellen.[228] Auch in Myelomazellen ist IL-6 als autokriner Faktor für Proliferation und Überleben notwendig.[230] BaF3-Zellen exprimieren den IL-6-Rezeptor nicht.[231] Allerdings wurde die Expression des IL-6-Rezeptors in leukämischen Blasten von Erwachsenen mit AML und AMLL sowie von Kindern mit t(4;11)-positiver ALL beschrieben.[232, 233] Die Überexpression von *IL-6* könnte in einer verstärkten IL-6-Ausschüttung hämatopoetischer Zellen mit der Translokation t(12;21) Zellen resultieren und dadurch diesen Zellen einen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil verschaffen, was die Ausbildung eines prä-leukämischen Klon begünstigt.

Der IL-8-Rezeptor β ist ein Chemokinrezeptor (CXCR2), der Affinitäten für verschiedene Liganden, u.a. IL-8, Gro- β , MIP-2, aufweist. Im hämatopoetischen System wird CXCR2 von Endothel- und Stromazellen und reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert, die auch IL-8 produzieren. Hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren CXCR2 eher gering. Von Endothelzellen sekretiertes IL-8 stimuliert die Extravasation von Leukozyten und wirkt als chemotaktischer Faktor für Neutrophile.[234] In verschiedenen Tumoren spielt IL-8 eine essenzielle Rolle bei der Tumorigenese, Angiogenese und Metastasierung.[235] Die Expression von *CXCR2* könnte somit zu einem veränderten Migrationsverhalten *ETV6/RUNX1*-exprimierender Zellen führen, das es ihnen ermöglicht, vorteilhafte Nischen im Knochenmark zu erschließen. IL-8 wirkt weiterhin als autokriner Wachstumsfaktor in Melanomzellen und anderen Tumorzellen.[235] IL-8 und CXCR2 stimulieren die Proliferation in Melanom-, Endothel-, Stromazellen und Fibroblasten und hemmen die Apoptose in B-CLL-Lymphozyten. Myeloide und lymphoide leukämische Zelllinien exprimieren CXCR2. Weiterhin wurde die *CXCR2*-Expression auf mRNA-Ebene in primären humanen AML-Blasten, nicht aber in ALL-Blasten, nachgewiesen.[234]

Unter den 77 hochregulierten Genen befanden sich auch *SerpinB1a*, *SerpinB9*, *SerpinE1 (PAI1)* und *SerpinI1*. *SerpinB1a* war mit einem Fold Change von 30 das am stärksten hochregulierte Gen in BaF3-Zellen infolge der *ETV6/RUNX1*-Expression. Die anderen Serpine wiesen Fold Changes zwischen 1,3 und 2,6 auf. Die Serpine bilden eine Superfamilie von ca. 500 Proteinen und sind Inhibitoren von Serin- und Zysteinproteasen. Die Serpine der Klasse B werden als Ovalbumin-Serpine bezeichnet und sind intrazelluläre Proteaseinhibitoren.[236] Einige Mitglieder erfüllen

andere Funktionen, z.B. reguliert PAI2 (SerpineB2) die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix.[237] Weitere Funktionen der ov-Serpine umfassen die Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung, der Motilität von Tumorzellen und der Angiogenese.[236] Viele ov-Serpine werden in Protease-sekretierenden Zellen exprimiert, z.B. SerpinB9 in zytotoxischen Lymphozyten. SerpinB9 ist ein potenter Inhibitor von GranzymB und schützt die Zellen, in denen es exprimiert wird, vor GranzymB-induzierter Apoptose und somit vor der Selbstzerstörung durch ihre eigenen Proteasen.[238] Ähnliche zytoprotektive Eigenschaften werden für andere ov-Serpine angenommen, z.B. SerpinB1a und PAI2. Für PAI2 und PI10 (SerpineB10) wurde nachgewiesen, dass sie zytoprotektiv gegen TNF α wirken.[237, 239] Folglich könnte auch SerpinB1a *ETV6/RUNX1*-exprimierende Zellen vor TNF α -induzierter Apoptose schützen. Classen et al. zeigten, dass SerpinB9 in Proben pädiatrischer ALL differenziell exprimiert wird und zwar unabhängig von ALL-Subtypen.[240] PI10 wird verstärkt in Patienten mit AML und CML exprimiert.[239] *SerpineB1a* wird stark in hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert. Während der myeloiden Entwicklung nimmt die Expression von *SerpineB1a* ab. Auch in den mononukleären Zellen des Knochenmarks von AML- und ALL-Patienten wurde eine starke *SerpineB1a*-Expression nachgewiesen. Weiterhin wird *SerpineB1a* in einer Reihe leukämischer Zelllinien exprimiert.[241]

IL-6, *CXCR2* und *SerpineB1a* wurden für weitere Versuche ausgewählt.

4.2.3. Validierung der differentiellen Expression

Die differentielle Expression der Gene *IL-6*, *CXCR2* und *SerpineB1a* wurde mittels quantitativer real time PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13).

SerpineB1a wurde in den *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Klonen 12 – 20fach hochreguliert, *CXCR2* wurde 10 – 12fach hochreguliert und *IL-6* wurde zwei – vierfach hochreguliert (Tab. 3.15). In den mittels Microarrays erstellten Genexpressionsdaten wiesen *SerpineB1a*, *CXCR2* und *IL-6* Fold Changes von 29, 3,6 und 3,1 auf. Die für *SerpineB1a* beobachtete Abweichung ist auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen. Korreliert man die Daten der beiden Methoden miteinander, zeigt sich für beide Datensätze die gleiche Tendenz für schwächer und stärker regulierte Gene. Je stärker die Regulation jedoch ist, desto weiter driften die mit den beiden Methoden ermittelten Werte voneinander ab.

Da wie oben erwähnt nicht immer eine direkte Korrelation zwischen mRNA und Proteinlevel besteht, wurde die differenzielle Expression der drei Gene zusätzlich auf Proteinebene nachgewiesen.

Die durchflusszytometrische Analyse der CXCR2-Expression zeigte, dass BaF3-Zellen und die BaF3-Klone mit Leervektor praktisch keine membranständigen Rezeptoren aufwiesen, während CXCR2 auf den BaF3-TO/TA-Klonen exprimiert wurde (Abb. 3.14). Die Expression von *ETV6/RUNX1* führte somit zu einer aberranten Expression von CXCR2 auf der Oberfläche von BaF3-Zellen. Das gleiche wurde für IL-6 beobachtet. Sekretiertes IL-6 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Während BaF3-Zellen und die BaF3-TO/LV-Klone kein IL-6 sekretierten, wurde im Überstand der BaF3-TO/TA-Klonen 40 – 100 pg / ml IL-6 gemessen (Abb. 3.15). Es ist möglich, dass sowohl CXCR2 als auch IL-6 intrazellulär vorhanden waren. Intrazelluläres Protein wurden mit beiden Methoden nicht nachgewiesen. Für die Funktionalität im zellbiologischen Kontext sind jedoch die Präsentation des Rezeptors auf der Oberfläche bzw. die Sekretion des Zytokins von Bedeutung. Die Expression von SerpinB1a wurde mittels 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen. Korrelierend mit dem Ergebnis der Genexpressionsanalyse war SerpinB1a das am stärksten hochregulierte Protein in den BaF3-TO/TA-Klonen. Es wurde auch in den Leervektor-Klonen exprimiert.

4.3. Funktionelle Untersuchungen

In spezifischen funktionellen Analysen wurde untersucht, ob die Dysregulation eines Gens eine funktionelle Konsequenz für die Zelle hat und wie diese aussieht.

Die Expression von IL-6 wird in Tumorzellen u.a. von $\text{TNF}\alpha$ reguliert. Durch die Stimulation der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und die Messung des sekretierten IL-6 wurde gezeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ zu einem Anstieg der IL-6-Ausschüttung in BaF3-Zellen führt und dass der Anstieg der IL-6-Ausschüttung in den *ETV6/RUNX1*-exprimierenden Klonen signifikant höher als in den Leervektor-Klonen ist (Abb. 3.18). Evans et al. zeigten, dass das progressive Wachstum immunogener Sarkomzellen in Mäusen von einem Anstieg der IL-6-Aktivität im Serum begleitet wurde und dass die IL-6-Ausschüttung von Sarkomzellen *in vitro* durch $\text{TNF}\alpha$ induziert wird. Da $\text{TNF}\alpha$ von tumor-assoziierten Makrophagen exprimiert wird, kann der beobachtete Anstieg der

IL-6-Aktivität im Serum auf eine Interaktion der tumor-assoziierten Makrophagen mit den Tumorzellen zurückgeführt werden. Die Tumorzelle kann durch die Ausschüttung von IL-6 über eine Rückkopplung die immunologische Tumorabwehr sowie wachstumshemmende Mechanismen regulieren.[177]

Um zu untersuchen, ob die aberrante IL-6-Sekretion den *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen einen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil verschafft, wäre die ektope Expression des IL-6-Rezeptors notwendig gewesen, da BaF3-Zellen den IL-6-Rezeptor nicht exprimieren.[231]

Eine zytoprotektive Funktion von SerpinB1a gegen $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose wurde in BaF3-TO/TA-Klonen nicht beobachtet.

Für die ov-Serpine PAI2 (SerpineB2) und PI10 (SerpineB10) wurde ein zytoprotektiver Effekt in HeLa-Zellen beschrieben.[237, 239] HeLa-Zellen, die ektope PAI2-exprimierten, wiesen bei Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ Überlebensraten von bis zu 80% auf. Dabei korrelierte die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration, die für eine mittlere letale Dosis benötigt wurde, mit der Höhe der PAI2-Expression. Die PAI2-vermittelte Resistenz gegen $\text{TNF}\alpha$ wurde im Konzentrationsbereich bis 10 ng / ml $\text{TNF}\alpha$ beobachtet, bei höheren Konzentrationen nahm der Effekt ab.[237] Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Expression von PI10 in HeLa-Zellen.[239] Es wurde nicht untersucht, ob die Expression von SerpinB1a BaF3-Zellen gegen andere zytotoxische Einflüsse schützt. Pardon-Barthe et al. zeigten, dass die Expression von SerpinB1a HeLa-Zellen vor Etoposid-induzierter Apoptose schützt.[242] Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu der hohen Sensitivität, die *ETV6/RUNX1*-positiver Blasten gegenüber Etoposid aufweisen.[159]

Die Auswahl der untersuchten Gene aufgrund ihrer bisher bekannten Funktion und evtl. Beteiligung an Tumor-relevanten Signalwegen stellt eine künstliche Selektion dar und spiegelt nicht ihre Relevanz für die Leukämogenese im Kontext der *ETV6/RUNX1*-Expression wieder. Funktionelle Untersuchungen weiterer Gene, für die in der Genexpressionsanalyse eine differenzielle Expression infolge der *ETV6/RUNX1*-Expression in BaF3-Zellen nachgewiesen wurde, sind daher notwendig, um einen tieferen Einblick zu erhalten, welche zellulären und molekularen Mechanismen durch das Fusionsgen fehlreguliert werden.

5. Zusammenfassung

Die Translokation t(12;21) tritt in 25% pädiatrischer BVZ-ALL auf. Sie resultiert in der Fusion der für die Hämatopoese relevanten Transkriptionsfaktorgene *ETV6* und *RUNX1* und der Expression eines chimären Fusionproteins, das als dominant negativer Repressor von *RUNX1*-Zielgenen wirkt. Es wird angenommen, dass *ETV6/RUNX1* über die Veränderung des Transkriptom der Zelle direkt zur Transformation der Zelle und somit zur Leukämogenese beiträgt. Es ist jedoch unbekannt, welche Gene von *ETV6/RUNX1* dysreguliert werden und wie sich ihre Fehlregulation auf die Zelle auswirkt.

Die durch *ETV6/RUNX1* dysregulierten Gene sollten in genomweiten Genexpressionsanalysen mittels Microarrays anhand eines zuvor etablierten zellulären Systems mit stabiler Expression des Fusionsgens identifiziert und der Effekt der Transgenexpression auf zellbiologischer Ebene untersucht werden.

Für die Etablierung des zellulären Systems wurde das Transgen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors mittels onkoretroviralem Getransfer in die murine pro-B-Zelllinie BaF3 eingebracht. Die häufige Mutation der Transgen- und der Vektorsequenz, die z.T. auf homologe Sequenzen im minimalen Promotor des Tet-Systems zurückzuführen war, machte die Selektion und die Charakterisierung einzelner BaF3-Klone sowie den Verzicht auf ein funktionelles Tet-System notwendig.

Die Expression von *ETV6/RUNX1* resultierte in einer schwachen, aber signifikanten Verzögerung des Übergangs der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, wie sie auch für andere CBF-Fusionsproteine, die mit der *RUNX1*-Transaktivierung der Genexpression interferieren, beobachtet wurde. Die Proliferation und die Apoptose blieben unbeeinflusst und *ETV6/RUNX1* vermittelte kein IL-3-unabhängiges Wachstum in BaF3-Zellen.

In der genomweiten Genexpressionsanalyse wurden 181 differenziell exprimierte Gene identifiziert. Davon waren in der Gruppe der *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Klone 77 Gene hoch- und 104 Gene herunterreguliert. Eine Koregulation der 66 Gene mit einem Fold Change ≥ 2 fand nicht statt, obwohl etwa 50% dieser Gene potenzielle *RUNX1*-Bindungsstellen im Promotor aufweisen.

Ein spezies-übergreifender Vergleich zeigte, dass die Genexpressionsprofile der *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Zellen und leukämischer Blasten von ALL-Patienten

keine Ähnlichkeit aufweisen. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass sich *ETV6/RUNX1*-positive ALL schrittweisen entwickeln und dass für die volle Transformation der Zelle weitere genetische Veränderungen notwendig sind.

Die Auswertung der differenziell exprimierten Gene hinsichtlich ihrer GO-Annotation zeigte, dass die GO-Kategorien „defense response“ und „response to biotic stimulus“ durch die 14 hochregulierten Genen *Blnk*, *CD55*, *IL8rb*, *Cblb*, *Nalp10*, *Tnf*, *Apaf1*, *Prkca*, *Slamf1*, *Ifi47*, *Lta*, *Lilrb3*, *IL-6*, *Lat2*, sowie die Kategorie „basolateral plasma membrane“ durch die fünf hochregulierten Gene *Col17a1*, *Itga4*, *Itga6*, *Slc12a6* und *Bcar1* überrepräsentiert waren. Kategorien, die sich auf den Zellzyklus beziehen, waren nicht überrepräsentiert. Unter den 181 differenziell exprimierten Genen wurden keine prominenten Zellzyklusgene gefunden.

Eine Reihe von Genen, die mit der Entwicklung hämatopoetischer Zellen assoziiert sind, wurde differenziell exprimiert. Darunter fanden sich die Gene *Lat2*, *Lat*, *Lilrb*, *Blnk*, *Pik3cd*, *BRDG-1*, die mit dem Signalweg des prä-B-Zellrezeptors assoziiert sind.

Die Expression von *ETV6/RUNX1* resultierte in BaF3-Zellen in einer aberranten Expression des Chemokinrezeptors IL-8R β (CXCR2) auf der Oberfläche der Zellen bzw. einer aberranten Sekretion des Zytokins IL-6. Der Serinproteaseinhibitor SerpinB1a war in *ETV6/RUNX1*-positiven BaF3-Zellen auf mRNA und auf Proteinebene das am stärksten hochregulierte Gen bzw. Protein.

Die Sekretion von IL-6 ist im Kontext seiner Funktion als autokriner Wachstumsfaktor in Tumorzellen sowie wegen seines stimulierenden Effekts auf die Proliferation, das Überleben und das Selbsterneuerungspotenzial hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen eine interessante Beobachtung.

Ein zytoprotektiver Effekt von SerpinB1a gegen TNF α , wie er für die Serinproteaseinhibitoren PAI2 und PI10 in HeLa-Zellen nachgewiesen wurde, wurde in BaF3-Zellen nicht beobachtet, schliesst jedoch nicht aus, dass andere Funktionen von SerpinB1a für die Transformation einer Zelle relevant sein können.

6. Literaturverzeichnis

1. Classen M., Diehl V., and K. K., *Innere Medizin*. Vol. 3. Auflage. 1994: Urban & Schwarzenberg Verlag.
2. Bühling K., Lepenies J., and W. K., *Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 3. Auflage. 2004: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
3. Herold, G., *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 1997: Selbstverlag.
4. Rossig, C. and H. Juergens, *Aetiology of childhood acute leukaemias: current status of knowledge*. *Radiat Prot Dosimetry*, 2008. **132**(2): p. 114-8.
5. Kebriaei, P., J. Anastasi, and R.A. Larson, *Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2002. **15**(4): p. 597-621.
6. Greaves, M., *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(3): p. 193-203.
7. Greaves, M.F., et al., *Leukemia in twins: lessons in natural history*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2321-33.
8. Wiemels, J.L., et al., *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. *Lancet*, 1999. **354**(9189): p. 1499-503.
9. Greaves, M.F. and J. Wiemels, *Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(9): p. 639-49.
10. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 157-62.
11. Creutzig, U., et al., *Krebserkrankungen bei Kindern: Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2003. **100**(13): p. 842-852.
12. Jaffe, E.S., et al., *Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. 2001, Lyon: IARC press.
13. Riehm, H., H. Gadner, and K. Welte, *[The west-berlin therapy study of acute lymphoblastic leukemia in childhood--report after 6 years (author's transl)]*. *Klin Padiatr*, 1977. **189**(8): p. 89-102.
14. Moricke, A., et al., *Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000*. *Leukemia*, 2010. **24**(2): p. 265-84.
15. Loning, L., et al., *Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy*. *Blood*, 2000. **95**(9): p. 2770-5.
16. Hijiya, N., et al., *Cumulative incidence of secondary neoplasms as a first event after childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Jama*, 2007. **297**(11): p. 1207-15.
17. Foon, K.A. and R.F. Todd, 3rd, *Immunologic classification of leukemia and lymphoma*. *Blood*, 1986. **68**(1): p. 1-31.
18. Pui, C.H., F.G. Behm, and W.M. Crist, *Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1993. **82**(2): p. 343-62.
19. Bene, M.C., et al., *Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias*. *Haematologica*, 1999. **84**(11): p. 1024-34.
20. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. *Leukemia*, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
21. Schabath, R., R. Ratei, and W.D. Ludwig, *Fortschritte in der Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien: Von FAB über MIC und REAL zu WHO*. *Journal of Laboratory Medicine*, 2003. **27**(7-8): p. 249-256.
22. Drexler, H.G., E. Thiel, and W.D. Ludwig, *Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 1991. **5**(8): p. 637-45.
23. Boveri, T., *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. 1914, Gustav Fischer: Jena.
24. Nowell PC and H. DA, *A minute chromosome in human granulocytic leukemia*. *Science* 1960. **132**(1497).
25. Raimondi, S.C., *Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1993. **81**(9): p. 2237-51.
26. Secker-Walker, L.M., S.D. Lawler, and R.M. Hardisty, *Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis*. *Br Med J*, 1978. **2**(6151): p. 1529-30.
27. Rubnitz, J.E. and C.H. Pui, *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Oncologist*, 1997. **2**(6): p. 374-380.

28. Heerema, N.A., et al., *Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4036-45.
29. Rubnitz, J.E. and A.T. Look, *Molecular genetics of childhood leukemias*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. **20**(1): p. 1-11.
30. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 1998. **339**(9): p. 605-15.
31. Behm, F.G., et al., *Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2870-7.
32. Romana, S.P., et al., *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4263-9.
33. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
34. Faderl, S., et al., *Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1998. **91**(11): p. 3995-4019.
35. Harrison, C.J. and L. Foroni, *Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. Rev Clin Exp Hematol, 2002. **6**(2): p. 91-113; discussion 200-2.
36. Harrison, C.J., *Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2009. **144**(2): p. 147-56.
37. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
38. Pinkel, D., et al., *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 207-11.
39. Pollack, J.R., et al., *Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 41-6.
40. Barrett, M.T., et al., *Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17765-70.
41. Mullighan, C.G., et al., *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 758-64.
42. Mullighan, C.G. and J.R. Downing, *Global genomic characterization of acute lymphoblastic leukemia*. Semin Hematol, 2009. **46**(1): p. 3-15.
43. Weinberg, R., *The Biology of Cancer*. 2007, New York: Garland Science.
44. Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 143-9.
45. Look, A.T., *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1059-64.
46. Armstrong, S.A. and A.T. Look, *Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6306-15.
47. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia*. Blood Rev, 2004. **18**(2): p. 115-36.
48. Pui, C.H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2008. **371**(9617): p. 1030-43.
49. Shivdasani, R.A. and S.H. Orkin, *The transcriptional control of hematopoiesis*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4025-39.
50. Golub, T.R., et al., *Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-16.
51. Baens, M., et al., *Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6*. Genome Res, 1996. **6**(5): p. 404-13.
52. Romana, S.P., et al., *The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3662-70.
53. Sasaki, K., et al., *Functional analysis of a dominant-negative DeltaETS TEL/ETV6 isoform*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(4): p. 1128-37.
54. Montpetit, A. and D. Sinnett, *Comparative analysis of the ETV6 gene in vertebrate genomes from pufferfish to human*. Oncogene, 2001. **20**(26): p. 3437-42.
55. Potter, M.D., et al., *Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3341-8.
56. Poirel, H., et al., *Characterization of a novel ETS gene, TELB, encoding a protein structurally and functionally related to TEL*. Oncogene, 2000. **19**(41): p. 4802-6.

57. Oikawa, T., *ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(8): p. 626-33.
58. Slupsky, C.M., et al., *Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(21): p. 12129-34.
59. Kim, C.A., et al., *Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression*. *Embo J*, 2001. **20**(15): p. 4173-82.
60. Kwiatkowski, B.A., et al., *The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(28): p. 17525-30.
61. Poirel, H., et al., *The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties*. *Oncogene*, 1997. **14**(3): p. 349-57.
62. Oikawa, T. and T. Yamada, *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. *Gene*, 2003. **303**: p. 11-34.
63. Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael, *Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity*. *Oncogene*, 2000. **19**(55): p. 6524-32.
64. Chakrabarti, S.R. and G. Nucifora, *The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **264**(3): p. 871-7.
65. Guidez, F., et al., *Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein*. *Blood*, 2000. **96**(7): p. 2557-61.
66. Boccuni, P., et al., *The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(17): p. 15412-20.
67. Lopez, R.G., et al., *TEL is a sequence-specific transcriptional repressor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(42): p. 30132-8.
68. Martinez, R. and T.R. Golub, *Transcriptional repression of ID1 by the leukemogenic ETS protein TEL (abstract)*. *Blood*, 2000. **96**: p. 453a.
69. Fenrick, R., et al., *TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(16): p. 5828-39.
70. Irvin, B.J., et al., *TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46378-86.
71. Arai, H., et al., *Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(1): p. 116-25.
72. Maki, K., et al., *Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through extracellular signal-regulated kinase-induced phosphorylation*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(8): p. 3227-37.
73. Chakrabarti, S.R., et al., *Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7467-72.
74. Wood, L.D., et al., *Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(6): p. 3257-62.
75. Chakrabarti, S.R., et al., *Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13281-5.
76. Lopez, R.G., C. Carron, and J. Ghysdael, *v-SRC specifically regulates the nucleo-cytoplasmic delocalization of the major isoform of TEL (ETV6)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(42): p. 41316-25.
77. Maroulakou, I.G. and D.B. Bowe, *Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network*. *Oncogene*, 2000. **19**(55): p. 6432-42.
78. Wang, L.C., et al., *Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL*. *Embo J*, 1997. **16**(14): p. 4374-83.
79. Wang, L.C., et al., *The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow*. *Genes Dev*, 1998. **12**(15): p. 2392-402.
80. Hock, H., et al., *Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival*. *Genes Dev*, 2004. **18**(19): p. 2336-41.
81. Yamagata, T., et al., *TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **347**(2): p. 517-26.
82. Waga, K., et al., *Leukemia-related transcription factor TEL accelerates differentiation of Friend erythroleukemia cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(1): p. 59-68.
83. Takahashi, W., et al., *TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM*. *Cancer Sci*, 2005. **96**(6): p. 340-8.

84. Kobayashi, H., et al., *Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases*. *Blood*, 1994. **84**(10): p. 3473-82.
85. Bohlander, S.K., *ETV6: a versatile player in leukemogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(3): p. 162-74.
86. Peeters, P., et al., *Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders*. *Cancer Res*, 1997. **57**(4): p. 564-9.
87. Buijs, A., et al., *The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(24): p. 9281-93.
88. Rawat, V.P., et al., *Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(3): p. 817-22.
89. Raynaud, S., et al., *The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 2891-9.
90. Gunji, H., et al., *TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(2): p. 623-30.
91. Nakamura, F., et al., *Cloning and characterization of the novel chimeric gene TEL/PTPRR in acute myelogenous leukemia with inv(12)(p13q13)*. *Cancer Res*, 2005. **65**(15): p. 6612-21.
92. Miyoshi, H., et al., *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(23): p. 10431-4.
93. Levanon, D., et al., *Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1*. *Gene*, 2001. **262**(1-2): p. 23-33.
94. Ogawa, E., et al., *PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(14): p. 6859-63.
95. Levanon, D., et al., *AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization*. *Genomics*, 1994. **23**(2): p. 425-32.
96. Ghozi, M.C., et al., *Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 1935-40.
97. Pozner, A., et al., *Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap- and internal ribosome entry site-dependent mechanisms*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(7): p. 2297-307.
98. Bee, T., et al., *Alternative Runx1 promoter usage in mouse developmental hematopoiesis*. *Blood Cells Mol Dis*, 2009. **43**(1): p. 35-42.
99. Pozner, A., et al., *Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis*. *BMC Dev Biol*, 2007. **7**: p. 84.
100. Levanon, D., et al., *Phylogenesis and regulated expression of the RUNT domain transcription factors RUNX1 and RUNX3*. *Blood Cells Mol Dis*, 2003. **30**(2): p. 161-3.
101. Ogawa, E., et al., *Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha*. *Virology*, 1993. **194**(1): p. 314-31.
102. Alcalay, M., et al., *Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*. *Oncogene*, 2001. **20**(40): p. 5680-94.
103. Huang, G., et al., *Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation*. *Embo J*, 2001. **20**(4): p. 723-33.
104. Westendorf, J.J. and S.W. Hiebert, *Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia*. *J Cell Biochem*, 1999. **Suppl 32-33**: p. 51-8.
105. Michaud, J., H.S. Scott, and R. Escher, *AML1 interconnected pathways of leukemogenesis*. *Cancer Invest*, 2003. **21**(1): p. 105-36.
106. Downing, J.R., et al., *Alterations of the AML1 transcription factor in human leukemia*. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. **11**(5): p. 347-60.
107. Wheeler, J.C., et al., *Mechanisms of transcriptional regulation by Runt domain proteins*. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. **11**(5): p. 369-75.
108. Lutterbach, B. and S.W. Hiebert, *Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation*. *Gene*, 2000. **245**(2): p. 223-35.
109. Tanaka, T., et al., *The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(7): p. 3967-79.

110. Wang, S., et al., *Regulation of RUNX1/AML1 during the G2/M transition*. Leuk Res, 2007. **31**(6): p. 839-51.
111. Otto, F., M. Lubbert, and M. Stock, *Upstream and downstream targets of RUNX proteins*. J Cell Biochem, 2003. **89**(1): p. 9-18.
112. Okuda, T., et al., *AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 321-30.
113. North, T.E., et al., *Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo*. Immunity, 2002. **16**(5): p. 661-72.
114. Chen, M.J., et al., *Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 887-91.
115. Takakura, N., et al., *A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis*. Cell, 2000. **102**(2): p. 199-209.
116. Yamagata, T., K. Maki, and K. Mitani, *Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis*. Int J Hematol, 2005. **82**(1): p. 1-8.
117. Ichikawa, M., et al., *AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 299-304.
118. Okuda, T., et al., *Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 319-28.
119. Nishimura, M., et al., *VWRPY motif-dependent and -independent roles of AML1/Runx1 transcription factor in murine hematopoietic development*. Blood, 2004. **103**(2): p. 562-70.
120. Tsuzuki, S., et al., *Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1*. PLoS Med, 2007. **4**(5): p. e172.
121. Tanaka, T., et al., *An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates transcriptional activation and hemopoietic myeloid cell differentiation antagonistically by two alternative spliced forms*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 299-302.
122. Fujita, Y., et al., *Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(5): p. 1248-55.
123. Bee, T., et al., *Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3042-50.
124. Bernardin, F. and A.D. Friedman, *AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3247-52.
125. Bernardin-Fried, F., et al., *AML1/RUNX1 increases during G1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces cyclin D3 gene expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15678-87.
126. De Braekeleer, E., C. Ferec, and M. De Braekeleer, *RUNX1 translocations in malignant hemopathies*. Anticancer Res, 2009. **29**(4): p. 1031-7.
127. Liu, P., et al., *Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia*. Science, 1993. **261**(5124): p. 1041-4.
128. Peterson, L.F. and D.E. Zhang, *The 8;21 translocation in leukemogenesis*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4255-62.
129. Hoogeveen, A.T., et al., *The transcriptional corepressor MTG16a contains a novel nucleolar targeting sequence deranged in t(16; 21)-positive myeloid malignancies*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6703-12.
130. Kurokawa, M. and H. Hirai, *Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies*. Cancer Sci, 2003. **94**(10): p. 841-6.
131. Mitani, K., *Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4263-9.
132. Niebuhr, B., et al., *Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(2): p. 211-8.
133. Romana, S.P., M. Le Coniat, and R. Berger, *t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **9**(3): p. 186-91.
134. Shurtleff, S.A., et al., *TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis*. Leukemia, 1995. **9**(12): p. 1985-9.
135. McLean, T.W., et al., *TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4252-8.
136. Aguiar, R.C., et al., *TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukaemia of adults*. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol, 1996. **95**(4): p. 673-7.

137. Raynaud, S., et al., *TEL/AML1 fusion gene is a rare event in adult acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(9): p. 1529-30.
138. Golub, T.R., et al., *Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4917-21.
139. Wiemels, J.L. and M. Greaves, *Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 4075-82.
140. van Dongen, J.J., et al., *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. Leukemia, 1999. **13**(12): p. 1901-28.
141. Codrington, R., et al., *Analysis of ETV6/AML1 abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia: incidence, alternative spliced forms and minimal residual disease value*. Br J Haematol, 2000. **111**(4): p. 1071-9.
142. Nakao, M., et al., *Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(9): p. 1463-70.
143. Hiebert, S.W., et al., *The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1349-55.
144. Fenrick, R., et al., *Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6566-74.
145. Hiebert, S.W., B. Lutterbach, and J. Amann, *Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(4): p. 197-200.
146. Lee, Y.J., et al., *Mechanism of transcriptional repression by TEL/RUNX1 fusion protein*. Mol Cells, 2004. **17**(2): p. 217-22.
147. Mori, H., et al., *Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8242-7.
148. Romana, S.P., et al., *Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21)*. Leukemia, 1996. **10**(1): p. 167-70.
149. Bernardin, F., et al., *TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 3904-8.
150. Fears, S., et al., *Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1949-54.
151. Uchida, H., et al., *Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 1015-22.
152. Song, H., et al., *Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter*. Mol Cells, 1999. **9**(5): p. 560-3.
153. Hiebert, S.W., et al., *Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins*. Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **48 Suppl 1**: p. S31-4.
154. Zelent, A., M. Greaves, and T. Enver, *Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4275-83.
155. Rho, J.K., et al., *Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(1): p. 91-5.
156. Morrow, M., et al., *TEL-AML1 preleukemic activity requires the DNA binding domain of AML1 and the dimerization and corepressor binding domains of TEL*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4404-14.
157. Borkhardt, A., et al., *Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group*. Blood, 1997. **90**(2): p. 571-7.
158. Ramakers-van Woerden, N.L., et al., *TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1094-9.
159. Frost, B.M., et al., *Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2452-7.
160. Loh, M.L., et al., *Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4508-13.
161. Bhojwani, D., et al., *ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy*. Leukemia, 2011.

162. Seeger, K., et al., *TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group.* Blood, 1998. **91**(5): p. 1716-22.
163. Ford, A.M., et al., *Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes.* Blood, 2001. **98**(3): p. 558-64.
164. Konrad, M., et al., *Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone.* Blood, 2003. **101**(9): p. 3635-40.
165. Wiemels, J.L., et al., *Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero.* Blood, 1999. **94**(3): p. 1057-62.
166. Alvarez, Y., et al., *Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia.* Cancer Genet Cytogenet, 2005. **162**(1): p. 21-9.
167. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.* Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
168. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
169. Poirel, H., et al., *Analysis of TEL proteins in human leukemias.* Oncogene, 1998. **16**(22): p. 2895-903.
170. Ho Sui, S.J., et al., *oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(10): p. 3154-64.
171. Jungblut, P.R. and R. Seifert, *Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells.* J Biochem Biophys Methods, 1990. **21**(1): p. 47-58.
172. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.* Anal Chem, 1996. **68**(5): p. 850-8.
173. Ross, M.E., et al., *Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling.* Blood, 2003. **102**(8): p. 2951-9.
174. Kirschner-Schwabe, R., et al., *Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4553-61.
175. Shimada, H., et al., *Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF.* Blood, 2000. **96**(2): p. 655-63.
176. Dunne, J., et al., *siRNA-mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation-associated gene expression in t(8;21)-positive cell lines and primary AML blasts.* Oncogene, 2006. **25**(45): p. 6067-78.
177. Evans, R., et al., *Tumor cell IL-6 gene expression is regulated by IL-1 alpha/beta and TNF alpha: proposed feedback mechanisms induced by the interaction of tumor cells and macrophages.* J Leukoc Biol, 1992. **52**(4): p. 463-8.
178. Mascarenhas, L., et al., *Gene delivery to human B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells.* Blood, 1998. **92**(10): p. 3537-45.
179. Kim, N.S., S.J. Kim, and G.M. Lee, *Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure.* Biotechnol Bioeng, 1998. **60**(6): p. 679-88.
180. Brielmeier, M., et al., *Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(9): p. 2082-5.
181. Miller, A.D. and F. Chen, *Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry.* J Virol, 1996. **70**(8): p. 5564-71.
182. Lam, J.S., et al., *Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope.* Hum Gene Ther, 1996. **7**(12): p. 1415-22.
183. Orlic, D., et al., *The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11097-102.
184. Golub, T.R., et al., *Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4107-16.
185. Ketteler, R., et al., *Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors.* Gene Ther, 2002. **9**(8): p. 477-87.
186. Melnick, J.S., et al., *An efficient rapid system for profiling the cellular activities of molecular libraries.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3153-8.

187. Shimamura, T., et al., *Non-small-cell lung cancer and Ba/F3 transformed cells harboring the ERBB2 G776insV_G/C mutation are sensitive to the dual-specific epidermal growth factor receptor and ERBB2 inhibitor HKI-272*. *Cancer Res*, 2006. **66**(13): p. 6487-91.
188. Yee, J.K., T. Friedmann, and J.C. Burns, *Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range*. *Methods Cell Biol*, 1994. **43 Pt A**: p. 99-112.
189. Sabatino, D.E., et al., *Amphotropic or gibbon ape leukemia virus retrovirus binding and transduction correlates with the level of receptor mRNA in human hematopoietic cell lines*. *Blood Cells Mol Dis*, 1997. **23**(3): p. 422-33.
190. Kavanaugh, M.P., et al., *Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(15): p. 7071-5.
191. Kustikova, O.S., et al., *Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population*. *Blood*, 2003. **102**(12): p. 3934-7.
192. Anderson, J.A., E.H. Bowman, and W.S. Hu, *Retroviral recombination rates do not increase linearly with marker distance and are limited by the size of the recombining subpopulation*. *J Virol*, 1998. **72**(2): p. 1195-202.
193. McIvor, R.S., *Deletion in a recombinant retroviral vector resulting from a cryptic splice donor signal in the Moloney leukemia virus envelope gene*. *Virology*, 1990. **176**(2): p. 652-5.
194. Marzio, G., et al., *In vitro evolution of a highly replicating, doxycycline-dependent HIV for applications in vaccine studies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(11): p. 6342-7.
195. Loew, R., et al., *Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression*. *BMC Biotechnol*. **10**: p. 81.
196. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
197. Rossi, F.M., et al., *Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16*. *Nat Genet*, 1998. **20**(4): p. 389-93.
198. Wu, X., et al., *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. *Science*, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
199. Yu, J., et al., *Construction and application of an inducible system for homogenous expression levels in bulk cell lines*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6445.
200. Bornkamm, G.W., et al., *Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(16): p. e137.
201. Brough, R., A.M. Papanastasiou, and A.C. Porter, *Stringent and reproducible tetracycline-regulated transgene expression by site-specific insertion at chromosomal loci with pre-characterised induction characteristics*. *BMC Mol Biol*, 2007. **8**: p. 30.
202. Jost, M., C. Kari, and U. Rodeck, *An episomal vector for stable tetracycline-regulated gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(15): p. 3131-4.
203. Rang, A. and H. Will, *The tetracycline-responsive promoter contains functional interferon-inducible response elements*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(5): p. 1120-5.
204. Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
205. Freundlieb, S., C. Schirra-Muller, and H. Bujard, *A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells*. *J Gene Med*, 1999. **1**(1): p. 4-12.
206. Klucher, K.M., D.V. Lopez, and G.Q. Daley, *Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3927-34.
207. Klucher, K.M., M.J. Gerlach, and G.Q. Daley, *A novel method to isolate cells with conditional gene expression using fluorescence activated cell sorting*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(23): p. 4858-60.
208. Swindle, C.S. and C.A. Klug, *Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002. **11**(3): p. 449-56.
209. Kummalue, T., J. Lou, and A.D. Friedman, *Multimerization via its myosin domain facilitates nuclear localization and inhibition of core binding factor (CBF) activities by the CBFbeta-smooth muscle myosin heavy chain myeloid leukemia oncoprotein*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(23): p. 8278-91.
210. Lou, J., et al., *Exogenous cdk4 overcomes reduced cdk4 RNA and inhibition of G1 progression in hematopoietic cells expressing a dominant-negative CBF - a model for overcoming inhibition of proliferation by CBF oncoproteins*. *Oncogene*, 2000. **19**(22): p. 2695-703.

211. Iijima, Y., et al., *Transformation of Ba/F3 cells and Rat-1 cells by ETV6/ARG*. *Oncogene*, 2002. **21**(28): p. 4374-83.
212. Yamasaki, N., et al., *Identification of Zfp521/ZNF521 as a cooperative gene for E2A-HLF to develop acute B-lineage leukemia*. *Oncogene*. **29**(13): p. 1963-75.
213. Britos-Bray, M., et al., *CBFbeta-SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents*. *Blood*, 1998. **92**(11): p. 4344-52.
214. Andreasson, P., et al., *The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001. **130**(2): p. 93-104.
215. Tsuzuki, S., et al., *Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(22): p. 8443-8.
216. Fischer, M., et al., *Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model*. *Oncogene*, 2005. **24**(51): p. 7579-91.
217. Morrow, M., et al., *TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3890-6.
218. Pui, C.H., et al., *Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update*. *J Clin Oncol*. **29**(5): p. 551-65.
219. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. *Cell*, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
220. Sintes, J., et al., *Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(9): p. 1199-204.
221. Wright, D.E., et al., *Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines*. *J Exp Med*, 2002. **195**(9): p. 1145-54.
222. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. *Immunity*, 1999. **10**(4): p. 463-71.
223. Barkhausen, T., C. Krettek, and M. van Griensven, *L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation*. *Exp Toxicol Pathol*, 2005. **57**(1): p. 39-52.
224. Fruehauf, S., et al., *Imatinib restores expression of CD62L in BCR-ABL-positive cells*. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(5): p. 600-3.
225. Herzog, S. and H. Jumaa, *The N terminus of the non-T cell activation linker (NTAL) confers inhibitory effects on pre-B cell differentiation*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2336-43.
226. Feldhahn, N., et al., *Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(11): p. 1837-52.
227. Ohya, K., et al., *Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 11976-81.
228. Kovacs, E. and J.J. Kuehn, *Measurements of IL-6, soluble IL-6 receptor and soluble gp130 in sera of B-cell lymphoma patients. Does viscum album treatment affect these parameters?* *Biomed Pharmacother*, 2002. **56**(3): p. 152-8.
229. Bernad, A., et al., *Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system*. *Immunity*, 1994. **1**(9): p. 725-31.
230. Gerlo, S., G. Haegeman, and W. Vanden Berghe, *Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells*. *Cell Signal*, 2008. **20**(8): p. 1489-96.
231. Gearing, D.P., et al., *Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(3): p. 1119-23.
232. Sugiyama, H., et al., *The expression of IL-6 and its related genes in acute leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 1996. **21**(1-2): p. 49-52.
233. Gu, L., et al., *Expression of interleukin-6 receptors by pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with the t(4;11) translocation: a possible target for therapy with recombinant IL6-Pseudomonas exotoxin*. *Leukemia*, 1997. **11**(10): p. 1779-86.
234. Hermouet, S., I. Corre, and E. Lippert, *Interleukin-8 and other agonists of Gi2 proteins: autocrine paracrine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **38**(1-2): p. 39-48.
235. Kakinuma, T. and S.T. Hwang, *Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis*. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(4): p. 639-51.
236. Silverman, G.A., et al., *The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33293-6.

237. Dickinson, J.L., et al., *Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27894-904.
238. Kaiserman, D. and P.I. Bird, *Control of granzymes by serpins.* Cell Death Differ. **17**(4): p. 586-95.
239. Schleef, R.R. and T.L. Chuang, *Protease inhibitor 10 inhibits tumor necrosis factor alpha - induced cell death. Evidence for the formation of intracellular high M(r) protease inhibitor 10-containing complexes.* J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26385-9.
240. Classen, C.F., et al., *The granzyme B inhibitor PI-9 is differentially expressed in all main subtypes of pediatric acute lymphoblastic leukemias.* Haematologica, 2004. **89**(11): p. 1314-21.
241. Missen, M.A., et al., *Stage specific gene expression of serpins and their cognate proteases during myeloid differentiation.* Br J Haematol, 2006. **135**(5): p. 715-24.
242. Padron-Barthe, L., et al., *Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(10): p. 1755-66.

7. Anhang

7.1. DSMZ-Beschreibung der Zelllinien BaF3, TMM und RO

	BaF3	TMM	RO
Spezies	murin	human	human
Phänotyp	pro-B-Zellen	B lymphoblastoid	B-lymphoblastoid
Ursprung	BALB/c-Maus	CML-Patient in Blastenkrise, BCR/ABL-negativ B-LCL, EBV+	SCID-Patient, Transformation mit EBV
Karyotyp	fast diploid, 33 % Polyploidie 40(36-42)<2n>	fast diploid, 8 % Polyploidie, 46(42-46)<2n>XY; kleine Ring in 6 % der Zellen,	fast diploid 8 % Polyploidie, 46(43-46)<2n>XY
Verdopplungszeit	20 Std.	20 – 40 Std.	40 – 50 Std.
Bemerkung	IL-3-abhängiges Wachstum	Zellen scheinen eher eine „normale“ lymphoblastoide Zelllinie zu sein	
Immunphänotyp		CD3-, CD10-, CD13-, CD14-, CD15-, CD19+, CD20+, CD33-, CD37+, HLA-DR+, s/c IgG-, s/c IgM-, s/c kappa+, s/c lambda-	CD3-, CD10-, CD13-, CD19+, CD20+, CD34-, CD37+, cyCD79a+, CD80+, CD138-, HLA-DR-, s/c IgG(5-10%)+, s/c IgM(20-40%)+, s/c kappa(5-10%)+, s/c lambda(10-20%)+

7.2. Oligonukleotide für die PCR

Tab. 7.1: Kombination der Primer für die Sequenzierung der ETV6/RUNX1-Sequenz der BaF3-TO/TA-Klone

Primer für PCR	Fragment	Sequenzierprimer
minCMV-for / TEL-509	667 bp	minCMVfor, TEL-509, TEL-213do, TEL-333
TEL-448for / AML1-B	~ 700 bp	TEL-448for, AML1-B, TEL-487up, AML1-D
AML1-Ex2-513 / AML1-950	437 bp	AML1-Ex3-524 / AML1-950, AML1-931, AML1-749, AML1-721
AML1-821 / AML1-7b-ex	~ 400 bp	AML1-821, AML1-7b-ex, AML1-891
AML1-1093 / CmR-for	~1090 bp	AML1-1093, AML1-1423, AML1-1680, AML1-1704

Tab. 7.2: Primer der In-Fusion-PCR-Klonierung

Primer	Sequenz	
inf_TA_for	pDNR-Dual + Kozak-Sequ. + ab <u>ATG</u> im Tel	GAAGTTATCAGTCGACGCCACCA <u>ATG</u> TCTGAGACTCCT GCTCAGTGTAGC
inf_forOK	pDNR-Dual + ab <u>ATG</u> im Tel	GAAGTTATCAGTCGAC <u>ATG</u> TCTGAGACTCCTGCTCAGT GTAGC
infAML_for	pDNR-Dual + Kozak-Sequ. + ab <u>ATG</u> im AML1	GAAGTTATCAGTCGACGCCACCA <u>ATG</u> GCTTCAGACAGC ATATTTGAGTC
infAML_fOK	pDNR-Dual + ab <u>ATG</u> im AML1	GAAGTTATCAGTCGAC <u>ATG</u> GCTTCAGACAGCATATTTG AG
inf_revTel	pDNR-Dual + ab <u>TGA</u> im Tel	ATGGTCTAGAAAGCTTT <u>CAG</u> CATTCATCTTCTTGGTAT ATTTGTTC
infrevTel(short)	pDNR-Dual + ab <u>TGA</u> im Tel	ATGGTCTAGAAAGCTTT <u>CAG</u> CATTCATCTTCTTGG
inf_TA_rev	pDNR-Dual + ab <u>TGA</u> im Aml1	ATGGTCTAGAAAGCTTT <u>CAG</u> TAGGGCCTCACACGGCC TCCTCCAG

Tab. 7.3: Sequenzen der Primer, die in verschiedenen Versuchen (1 – 5) verwendet wurden, sowie der Primer und Sonden für die real time-PCR:

- 1 PCR-Screening nach In-Fusion-PCR-Klonierung
- 2 Sequenzierung der cDNA-Sequenzen im Donorvektor pDNR-Dual nach In-Fusion-PCR-Klonierung
- 3 Screening der BaF3-Klone – genomische Integration
- 4 Screening der BaF3-TO/TA- und BaF3-TO/LV-Klone
- 5 Sequenzierung der ETV6/RUNX1-Sequenz der BaF3-TO/TA-Klone

Primer / Sonde	Sequenz	Annealing-temp. (°C)	Versuch
<i>TEL-spezifisch</i>			
TEL-1190	CTG GAC ATT TTC TCA TAG GTC	60	1
TEL-16up	CTG TGA GAC ATG TCT GAG A	62	1, 2
TEL-213do	CCA CTG GGC TAC GTC ATC C	62	2, 5
TEL-554do	TGA CCT GGA GCG GTG CAA CAG	70	2
TEL-487up	ATA ACT GTG TCC AGA GGA CCC	64	2
TEL-A	TGC ACC CTC TGA TCC TGA AC	62	2, 3, 4
TEL-1117	CAA AAT ATT CCG GAT AGT GGA TCC	68	2
TEL-509	ATT ATC CAC GGA TGG CCT GG	62	3, 5
TEL-448	ACA CAG CCG GAG GTC ATA CT	62	3
TEL-93	TGG GCT CTC TGG AGG TGT AT	62	3, 4
TEL-213	CCA CTG GGC TAC GTC ATC C	62	3
TEL-333	GCG AAA GTC CTC TTT GGT CA	60	3, 5
TEL-C	AAG CCC ATC AAC CTC TCT CAT C	66	3
TEL-448for	ACA CAG CCG GAG GTC ATA CT	62	5

Fortsetzung nächste Seite

Primer / Sonde	Sequenz	Annealing-temp. (°C)	Versuch
<i>AML1-spezifisch</i>			
AML1-B	TGG AAG GCG GCG TGA AGC	60	1, 2, 3, 4, 5
AML1-D	TGG AAG GCG GCG TGA AGC	60	5
AML1-7b-ex	CAC AGA AGG AGA GGC AAT GG	62	1, 3, 5
AML1-821	GAT GGC ACT CTG GTC ACT GTG	62	1, 2, 3, 5
AML1-1093	CTC GGA AAA GGA CAA GCT CC	62	2, 5
AML 931	CCT CCT CCA CTT CGA CCG AC	64	5
AML1-1423	CTG ACA GCG TTC AGC GAC C		2, 3
AML1-1680	CTC CTA CCA GTT CTC CAT GG		2, 3
AML1-Ex3-524	CGC TTC ACG CCG CCT TCC AC		2
AML1-Ex2-513	GGA ATG AAT CCT TCT AGA GAC GTC	70	3, 5
AML1-1093up	GGA GCT TGT CCT TTT CCG AG	62	3
AML 891	GCC ATG AAG AAC CAG GTT GC	62	5
AML1-950	CCA CTT CGA CCG ACA AAC CTG	66	3, 5
AML1-1704	CCA CCA TGG AGA ACT GGT AGG A	68	3
AML1-721	GAC AGC CCC AAC TTC CTC T	60	3
AML1-749	AGCACG GAG CAG AGG AAG T	60	3
<i>sonstige Primer</i>			
pDNR-for	CCG CAT AAC TTC GTA TGC	56	1
pDNR-rev	ATG ATT ATG ACC ACT TAC C	52	1
Hygro-for	GAT TTC GGC TCC AAC AAT GTC	62	3
Hygro-rev	GAT GTT GGC GAC CTC GTA TT	60	3
PCP1	GCT CAC CGT CTT TCA TTG CC	62	3
PCP2	TCC GCT CAT GAG ACA ATA ACC	62	3, 4
minCMV-for	ATC CAC GCT GTT TTG ACC TC	60	3, 5
CmR-for	TTC ATC ATG CCG TTT GTG A	54	3, 5
PhCMV-rev	TCT GAC GGT TCA CTA AAC GAG	62	3
minCMV-rev	ATC GGT CCC GGT GTC TTC TAT	64	3
minCMV-for2	CTG ACT GAT CCC GCA GAT TG	62	3, 4
Hygro-rev2	TTC GGT CGG CAT CTA CTC TAT T	64	3
Hygro-rev3	CGA ACT GTG GAC GAG AAC TGT	64	3
minCMV-rev2	CCG GAC CGA TCA TTC CAC GCT	64	3
Neo-for	TTT TGT CAA GAC CGA CCT GTC C	66	4
Neo-rev	CGG GAG CGG CGA TAC CGT AAA G	72	4
<i>real time PCR</i>			
mRPL13ex4f	GCG GAT GAA TAC CAA CCC	56	
mRPL13ex6r	GTA GGC TTC AGC CGA ACA AC	62	
GusB-F	CGATTATCCAGAGCGAGTAGGAGCA	63,3	
GusB-R	CGATTACTCTCAGCGGTGACTGGTT	63,1	
GusB-TM	FAM-TCCTCACTGAAACTGCGAGGCGGG-BBQ	70,7	
TEL S	GAAGGGAAGCCCATCAACCTC	60,2	
AEX3	TGAAGCGGCGGCTCGT	61,8	
TM TEL/AML	FAM-CCATGCCCATTTGGGAGAATAGCA-XTPH	64,9	

7.3. Genlisten

Tab. 7.4: Hochregulierte Gene in *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen, sortiert nach fdr

Nr.	fold change	q.value (fdr)	p.value	Probe Set	Symbol	Description
1	2,719	0.000231	1.34e-08	1418799_a_at	Col17a1	procollagen, type XVII, alpha 1
2	29,081	0.001883	6.15e-07	1416318_at	Serpnb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a
3	2,253	0.001883	6.26e-07	1451780_at	Blnk	B-cell linker
4	3,615	0.002025	7.63e-07	1417382_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
5	28,740	0.002492	1.05e-06	1448301_s_at	Serpnb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a
6	1,528	0.003908	1.99e-06	1460242_at	Cd55	CD55 antigen
7	3,222	0.004403	2.34e-06	1433763_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
8	3,853	0.004547	2.53e-06	1417384_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
9	1,935	0.004547	2.62e-06	1435611_x_at	Ela3	elastase 3, pancreatic
10	3,229	0.004784	2.97e-06	1417383_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
11	1,506	0.005033	3.24e-06	1434500_at	Ttyh2	tweety homolog 2 (Drosophila)
12	1,515	0.005095	3.62e-06	1418762_at	Cd55	CD55 antigen
13	1,834	0.006676	5.53e-06	1460674_at	Paqr7	progesterin and adipoQ receptor family member VII
14	3,057	0.007130	6.25e-06	1421734_at	Il8rb	interleukin 8 receptor, beta
15	2,809	0.007747	7.73e-06	1452321_at	Brwd1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
16	1,559	0.008213	8.38e-06	1415884_at	Ela3	elastase 3, pancreatic
17	4,228	0.008420	9.15e-06	1435012_x_at	Ela3	elastase 3, pancreatic
18	3,099	0.009894	1.14e-05	1416230_at	Rfk	riboflavin kinase
19	2,336	0.010046	1.23e-05	1427322_at	Brwd1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
20	5,249	0.010064	1.25e-05	1422445_at	Itga6	integrin alpha 6
21	2,035	0.010774	1.48e-05	1455082_at	Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b
22	1,536	0.011545	1.77e-05	1456980_at	9830134C10Rik	RIKEN cDNA 9830134C10 gene
23	5,385	0.011936	1.85e-05	1422444_at	Itga6	integrin alpha 6
24	1,789	0.013131	2.13e-05	1437304_at	Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b
25	3,008	0.013553	2.23e-05	1416229_at	Rfk	riboflavin kinase
26	3,485	0.014326	2.57e-05	1437326_x_at	Ela3	elastase 3, pancreatic
27	2,868	0.014326	2.56e-05	1451765_a_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
28	1,999	0.014326	2.64e-05	1452322_a_at	Brwd1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
29	1,870	0.014879	2.80e-05	1427387_a_at	Itgb4	integrin beta 4
30	6,004	0.015470	2.98e-05	1448471_a_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha
31	1,632	0.015914	3.11e-05	1426234_s_at	BC002199	cDNA sequence BC002199
32	1,554	0.016352	3.26e-05	1415834_at	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
33	1,349	0.016352	3.24e-05	1448715_x_at	Ccm4l	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)
34	4,566	0.016716	3.41e-05	1421098_at	AI586015	expressed sequence AI586015
35	3,021	0.016716	3.39e-05	1415737_at	Rfk	riboflavin kinase
36	6,004	0.017312	3.65e-05	1456211_at	Nalp10	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 10
37	1,613	0.017312	3.73e-05	1419607_at	Tnf	tumor necrosis factor
38	1,592	0.017312	3.88e-05	1426903_at	Fndc3a	fibronectin type III domain containing 3a
39	5,556	0.018063	4.13e-05	1416811_s_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha
40	2,088	0.019027	4.47e-05	1416702_at	Serpini1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1
41	1,551	0.020823	5.03e-05	1416740_at	Col5a1	procollagen, type V, alpha 1
42	2,083	0.022701	5.64e-05	1434307_at	Tmem64	transmembrane protein 64
43	3,605	0.022979	5.84e-05	1449537_at	Msh5	mutS homolog 5 (E. coli)
44	1,986	0.022979	5.86e-05	1415883_a_at	Ela3	elastase 3, pancreatic
45	7,210	0.024586	6.63e-05	1418835_at	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
46	2,846	0.025624	7.10e-05	1448716_at	Hba-x	hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex
47	1,473	0.026886	7.57e-05	1451050_at	Nt5c3	5'-nucleotidase, cytosolic III
48	1,634	0.027907	8.11e-05	1415996_at	Txnip	thioredoxin interacting protein
49	1,590	0.028259	8.27e-05	1428443_a_at	Rap1gap	Rap1 GTPase-activating protein
50	1,377	0.030434	9.11e-05	1437917_at	D530037H12Rik	RIKEN cDNA D530037H12 gene
51	1,844	0.030727	9.40e-05	1446598_at	Prkca	protein kinase C, alpha
52	1,614	0.030727	9.34e-05	1452870_at	Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1
53	2,408	0.030841	9.56e-05	1435287_at	Add2	adducin 2 (beta)
54	2,111	0.030841	9.57e-05	1425569_a_at	Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
55	1,320	0.032145	0.000101	1442393_at	Zfx1b	zinc finger homeobox 1b
56	1,520	0.032166	0.000102	1441584_at	Fli1	Friend leukemia integration 1
57	1,785	0.033036	0.000107	1417426_at	Prg1	proteoglycan 1, secretory granule
58	1,564	0.033324	0.000109	1431074_a_at	Pitpnc1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
59	1,334	0.034786	0.000115	1455316_x_at	Kcnh6	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	fold change	q.value (fdr)	p.value	Probe Set	Symbol	Description
60	1,490	0.035530	0.000121	1448721_at	D1Erd622e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 622, expressed
61	1,436	0.035762	0.000122	1419170_at	Tmem157	transmembrane protein 157
62	1,479	0.037811	0.000134	1452940_x_at	Pitpnc1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
63	1,576	0.038584	0.000139	1448443_at	Serpini1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1
64	3,519	0.038932	0.000143	1430771_a_at	Msh5	mutS homolog 5 (E. coli)
65	2,024	0.038932	0.000142	1417292_at	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47
66	1,339	0.039254	0.000145	1418645_at	Hal	histidine ammonia lyase
67	1,294	0.041336	0.000156	1443906_at	Cd55	CD55 antigen
68	1,269	0.041461	0.000159	1418980_a_at	Cnp1	cyclic nucleotide phosphodiesterase 1
69	1,785	0.041856	0.000161	1451481_s_at	Osta	organic solute transporter alpha
70	2,641	0.042208	0.000173	1454709_at	Tmem64	transmembrane protein 64
71	2,518	0.042208	0.000171	1451914_a_at	Add2	adducin 2 (beta)
72	2,261	0.042208	0.000167	1422952_at	Ng23	Ng23 protein
73	1,840	0.042208	0.000169	1420353_at	Lta	lymphotoxin A
74	1,472	0.042208	0.000167	1451218_at	Edem1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
75	1,325	0.042208	0.000174	1436933_at	Akap13	A kinase (PRKA) anchor protein 13
76	2,139	0.042242	0.000176	1425570_at	Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
77	1,545	0.042923	0.000180	1434725_at	Gramd1c	GRAM domain containing 1C
78	2,145	0.043134	0.000183	1421307_at	Car13	carbonic anhydrase 13
79	1,828	0.043134	0.000184	1458469_at	Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b
80	1,690	0.043711	0.000188	1422601_at	Serpnb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
81	1,473	0.043711	0.000188	1449878_a_at	Slc12a6	solute carrier family 12, member 6
82	2,645	0.044456	0.000194	1424302_at	Lilrb3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
83	1,644	0.044521	0.000196	1424888_at	March2	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2
84	1,622	0.044521	0.000196	1435066_at	Pitpnc1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
85	1,571	0.044820	0.000199	1439669_at	6430571L13Rik	RIKEN cDNA 6430571L13 gene
86	3,563	0.045065	0.000203	1450297_at	Il6	interleukin 6
87	1,697	0.045065	0.000201	1415997_at	Txnip	thioredoxin interacting protein
88	1,632	0.045065	0.000202	1439087_a_at	5830455E04Rik	RIKEN cDNA 5830455E04 gene
89	4,931	0.045183	0.000206	1426169_a_at	Lat2	linker for activation of T cells family, member 2
90	3,758	0.045371	0.000208	1422316_at	Gp1ba	glycoprotein 1b, alpha polypeptide
91	1,451	0.045400	0.000212	1425274_at	Asph	aspartate-beta-hydroxylase
92	1,294	0.045685	0.000215	1439388_s_at	Bcar1	breast cancer anti-estrogen resistance 1
93	1,550	0.046688	0.000222	1428025_s_at	Pitpnc1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
94	2,034	0.047064	0.000226	1450442_at	Add2	adducin 2 (beta)
95	1,519	0.047064	0.000229	1428492_at	Glipr2	GLI pathogenesis-related 2
96	1,435	0.047064	0.000228	1452803_at	Glipr2	GLI pathogenesis-related 2
97	1,254	0.047959	0.000235	1419149_at	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
98	1,648	0.048292	0.000239	1423488_at	Mmd	monocyte to macrophage differentiation-associated
99	1,235	0.048292	0.000238	1444992_at	Chst11	carbohydrate sulfotransferase 11
100	1,367	0.048642	0.000243	1454706_at	Uvrag	UV radiation resistance associated gene
101	1,548	0.050024	0.000252	1419322_at	Fgd6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6
102	1,289	0.050024	0.000253	1438064_at	Ybx1	Y box protein 1
103	1,391	0.050316	0.000256	1453750_x_at	Pitpnc1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
104	1,577	0.050352	0.000258	1430051_at	4930486L24Rik	RIKEN cDNA 4930486L24 gene
105	2,507	0.051230	0.000271	1433735_a_at	Tmem64	transmembrane protein 64
106	1,506	0.051230	0.000269	1437829_s_at	Eef2k	eukaryotic elongation factor-2 kinase
107	1,237	0.051230	0.000270	1438882_at	Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18
108	1,274	0.051601	0.000275	1455665_at	Lonrf1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1
109	2,025	0.052378	0.000286	1420502_at	Sat1	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1
110	3,114	0.053007	0.000295	1452352_at	Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta

Tab. 7.5: Herunterregulierte Gene in *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen, sortiert nach fdr

Nr.	fold change	q.value (fdr)	p.value	Probe Set	Symbol	Beschreibung
1	3,267	8.23e-05	1.82e-09	1423519_at	2210412D01Rik	RIKEN cDNA 2210412D01 gene
2	24,899	0.000231	2.05e-08	1450276_a_at	Scin	scinderin
3	2,639	0.000231	1.72e-08	1435505_at	Dmwd	dystrophia myotonica-containing WD repeat motif
4	14,084	0.000338	3.90e-08	1434944_at	Dmpk	dystrophia myotonica-protein kinase
5	6,152	0.000338	4.56e-08	1446771_at	Tuba8	tubulin, alpha 8
6	2,378	0.000338	5.25e-08	1433653_at	BC029169	cDNA sequence BC029169
7	6,812	0.000492	8.73e-08	1419518_at	Tuba8	tubulin, alpha 8
8	1,917	0.000534	1.07e-07	1420918_at	Sgk3	serum/glucocorticoid regulated kinase 3
9	1,714	0.000901	2.00e-07	1450036_at	Sgk3	serum/glucocorticoid regulated kinase 3
10	2,549	0.001080	2.82e-07	1417216_at	Pim2	proviral integration site 2
11	2,283	0.001080	2.87e-07	1449331_a_at	Rapsn	receptor-associated protein of the synapse
12	3,361	0.001168	3.37e-07	1460651_at	Lat	linker for activation of T cells
13	6,046	0.001925	6.83e-07	1429089_s_at	2900026A02Rik	RIKEN cDNA 2900026A02 gene
14	2,346	0.002222	8.87e-07	1423754_at	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
15	1,970	0.002890	1.28e-06	1420919_at	Sgk3	serum/glucocorticoid regulated kinase 3
16	1,775	0.002924	1.36e-06	1422991_at	Pik3cd	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide
17	1,607	0.003314	1.62e-06	1438943_x_at	Rpn1	ribophorin I
18	3,099	0.004729	2.83e-06	1423590_at	Napsa	napsin A aspartic peptidase
19	5,913	0.005095	3.70e-06	1434028_at	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
20	2,266	0.005095	3.50e-06	1428942_at	Mt2	metallothionein 2
21	1,959	0.005095	3.73e-06	1420927_at	St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1
22	6,690	0.005247	3.96e-06	1421256_at	Gzmc	granzyme C
23	1,769	0.005424	4.21e-06	1454801_at	Ankrd28	ankyrin repeat domain 28
24	1,891	0.006390	5.10e-06	1440865_at	Ifitm6	interferon induced transmembrane protein 6
25	2,656	0.006676	5.62e-06	1421890_at	St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
26	2,971	0.007130	6.48e-06	1418004_a_at	1810009M01Rik	RIKEN cDNA 1810009M01 gene
27	2,481	0.007130	6.47e-06	1455826_a_at	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1
28	1,576	0.007133	6.64e-06	1416273_at	Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
29	1,912	0.007392	7.05e-06	1438475_at	AB124611	cDNA sequence AB124611
30	2,347	0.007409	7.23e-06	1422041_at	Pilrb1	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1
31	2,282	0.008392	8.75e-06	1423231_at	Nrgn	neurogranin
32	1,560	0.008416	8.96e-06	1456438_x_at	Rpn1	ribophorin I
33	1,539	0.009025	1.00e-05	1418539_a_at	Ptpre	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
34	3,918	0.009201	1.04e-05	1420928_at	St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1
35	2,218	0.010046	1.22e-05	1422992_s_at	Pik3cd	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide
36	1,835	0.010046	1.19e-05	1424674_at	Slc39a6	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 6
37	1,854	0.010350	1.31e-05	1427475_a_at	LOC669660	
38	1,554	0.010350	1.33e-05	1439257_x_at	Rpn1	ribophorin I
39	2,784	0.010501	1.37e-05	1421891_at	St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
40	1,751	0.010747	1.43e-05	1460219_at	Mag	myelin-associated glycoprotein
41	2,120	0.010774	1.47e-05	1438316_a_at	Ccdc102a	coiled-coil domain containing 102A
42	1,559	0.010792	1.51e-05	1448353_x_at	Rpn1	ribophorin I
43	2,095	0.010797	1.56e-05	1418191_at	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
44	1,861	0.010797	1.54e-05	1438855_x_at	Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
45	1,840	0.011290	1.68e-05	1433920_at	Sema4c	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C
46	1,800	0.011290	1.67e-05	1423350_at	Socs5	suppressor of cytokine signaling 5
47	1,454	0.011545	1.75e-05	1435694_at	Pip5k2b	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, beta
48	1,508	0.012107	1.91e-05	1434214_at	0910001L09Rik	RIKEN cDNA 0910001L09 gene
49	1,600	0.012814	2.05e-05	1425942_a_at	Gpm6b	glycoprotein m6b
50	2,027	0.013553	2.25e-05	1423909_at	0610011I04Rik	RIKEN cDNA 0610011I04 gene
51	2,061	0.013908	2.37e-05	1453281_at	Pik3cd	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide
52	1,632	0.013908	2.36e-05	1450384_at	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1
53	1,744	0.014326	2.60e-05	1449366_at	Mmp8	matrix metalloproteinase 8
54	1,711	0.014326	2.58e-05	1438429_at	2610319H10Rik	RIKEN cDNA 2610319H10 gene
55	1,634	0.014326	2.63e-05	1449519_at	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
56	1,375	0.014879	2.80e-05	1439516_at	2610201A13Rik	RIKEN cDNA 2610201A13 gene
57	1,520	0.015349	2.93e-05	1440815_x_at	LOC62411214 B	
58	1,927	0.016822	3.47e-05	1451046_at	Zfp1	zinc finger protein, multitype 1
59	1,529	0.016884	3.52e-05	1459601_at	Snf1lk	SNF1-like kinase
60	2,916	0.017312	3.78e-05	1422989_a_at	Dmpk	dystrophia myotonica-protein kinase
61	2,062	0.017312	3.85e-05	1450240_a_at	Syt1	synaptotagmin-like 1
62	1,567	0.017312	3.74e-05	1423349_at	Socs5	suppressor of cytokine signaling 5

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	fold change	q.value (fdr)	p.value	Probe Set	Symbol	Beschreibung
63	1,330	0.017312	3.84e-05	1435170_at	Tsr2	TSR2, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)
64	1,373	0.017996	4.07e-05	1448733_at	Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
65	1,548	0.018594	4.32e-05	1416470_a_at	Rpn1	ribophorin I
66	1,437	0.018594	4.33e-05	1435672_at	3830612M24	
67	4,184	0.020427	4.86e-05	1451786_at	Muc20	mucin 20
68	1,331	0.020427	4.89e-05	1428622_at	Depdc6	DEP domain containing 6
69	2,052	0.021765	5.32e-05	1439814_at	Atp8b4	ATPase, class I, type 8B, member 4
70	1,326	0.021765	5.36e-05	1416151_at	Sfrs3	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20)
71	1,671	0.022885	5.73e-05	1423091_a_at	Gpm6b	glycoprotein m6b
72	1,530	0.023282	5.99e-05	1435676_at	Cep164	centrosomal protein 164
73	1,953	0.023324	6.19e-05	1451363_a_at	Dennd2d	DENN/MADD domain containing 2D
74	1,886	0.023324	6.21e-05	1421824_at	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1
75	1,670	0.023324	6.10e-05	1422863_s_at	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
76	1,368	0.023324	6.18e-05	1428644_at	Mgat5	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5
77	1,282	0.024586	6.65e-05	1424181_at	Sept6	septin 6
78	2,619	0.024606	6.71e-05	1448710_at	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
79	1,660	0.024618	6.77e-05	1448110_at	Sema4a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A
80	1,560	0.026389	7.37e-05	1418540_a_at	Ptpre	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
81	3,605	0.027907	8.09e-05	1425215_at	Ffar2	free fatty acid receptor 2
82	1,435	0.027907	8.08e-05	1443916_at	2900026A02Rik	RIKEN cDNA 2900026A02 gene
83	1,324	0.027907	8.06e-05	1451069_at	Pim3	proviral integration site 3
84	1,339	0.028468	8.40e-05	1417225_at	Arl6ip5	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 5
85	8,503	0.028524	8.47e-05	1452279_at	Cfp	complement factor properdin
86	1,418	0.030727	9.28e-05	1445522_at	Atp8b4	ATPase, class I, type 8B, member 4
87	1,508	0.031159	9.74e-05	1416009_at	Tspan3	tetraspanin 3
88	1,742	0.032386	0.000103	1425603_at	0610011104Rik	RIKEN cDNA 0610011104 gene
89	1,663	0.033036	0.000108	1422557_s_at	Mt1	metallothionein 1
90	1,578	0.033036	0.000108	1420670_at	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
91	2,312	0.035040	0.000117	1449124_at	Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
92	2,886	0.035092	0.000117	1420444_at	Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3
93	3,149	0.035530	0.000120	1421892_at	St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
94	1,282	0.036145	0.000124	1448563_at	Phb	prohibitin
95	1,652	0.036398	0.000127	1436230_at	Gpr114	G protein-coupled receptor 114
96	1,250	0.036398	0.000126	1455195_at	Rps24	ribosomal protein S24
97	1,941	0.037642	0.000132	1422861_s_at	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
98	1,483	0.037811	0.000134	1429189_at	1110007C02Rik	RIKEN cDNA 1110007C02 gene
99	1,508	0.038165	0.000136	1434630_at	Ankrd28	ankyrin repeat domain 28
100	7,595	0.038584	0.000139	1419480_at	Sell	selectin, lymphocyte
101	1,279	0.038932	0.000143	1436193_at	Man1c1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1
102	1,555	0.040375	0.000150	1448291_at	Mmp9	matrix metalloproteinase 9
103	1,320	0.040624	0.000152	1441163_at	Med12l	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog (yeast)-like
104	1,759	0.041336	0.000157	1416065_a_at	Ankrd10	ankyrin repeat domain 10
105	1,275	0.041336	0.000158	1417901_a_at	Ica1	islet cell autoantigen 1
106	2,486	0.041927	0.000163	1425962_at	Klrb1f	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F
107	1,637	0.041927	0.000164	1429525_s_at	Myo1f	myosin IF
108	2,172	0.042208	0.000173	1426829_at	Rxrip110	retinoid X receptor interacting protein 110
109	1,804	0.042208	0.000170	1430148_at	Rab19	RAB19, member RAS oncogene family
110	1,708	0.042208	0.000172	1438712_at	Cept1	choline/ethanolaminephosphotransferase 1
111	1,400	0.042208	0.000168	1425053_at	Isoc1	isochorismatase domain containing 1
112	1,936	0.042242	0.000176	1427962_at	Ccdc102a	coiled-coil domain containing 102A
113	1,476	0.043113	0.000182	1451166_a_at	Ccdc101	coiled-coil domain containing 101
114	1,466	0.044012	0.000190	1428507_at	Hdhd2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2
115	1,321	0.044456	0.000194	1428581_at	1700024G10Rik	RIKEN cDNA 1700024G10 gene
116	1,630	0.045183	0.000206	1440662_at	Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
117	1,291	0.045183	0.000205	1456036_x_at	Gsto1	glutathione S-transferase omega 1
118	1,505	0.045373	0.000209	1449414_at	Zfp53	zinc finger protein 53
119	1,866	0.045400	0.000211	1420669_at	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
120	1,332	0.045400	0.000212	1460253_at	Cmtrn7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
121	1,287	0.045873	0.000217	1424143_a_at	Cdt1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
122	1,285	0.046688	0.000223	1452774_at	Hnrpa3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
123	1,540	0.047064	0.000230	1450997_at	Stk17b	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
124	1,267	0.047064	0.000228	1418387_at	4930548G07Rik	RIKEN cDNA 4930548G07 gene
125	6,921	0.048436	0.000241	1419481_at	Sell	selectin, lymphocyte
126	2,556	0.050024	0.000251	1457722_at	Klrb1f	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	fold change	q.value (fdr)	p.value	Probe Set	Symbol	Beschreibung
127	1,279	0.050316	0.000257	1451244_a_at	Zfp422	zinc finger protein 422
128	3,585	0.050558	0.000260	1425216_at	Ffar2	free fatty acid receptor 2
129	1,430	0.050558	0.000261	1441811_x_at	0610011104Rik	RIKEN cDNA 0610011104 gene
130	1,558	0.051230	0.000271	1424675_at	Slc39a6	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 6
131	1,435	0.051230	0.000268	1436521_at	Slc36a2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2
132	1,252	0.051230	0.000271	1446894_at	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
133	1,310	0.052238	0.000279	1419273_at	C80913	expressed sequence C80913
134	1,988	0.052291	0.000282	1418929_at	Ift57	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)
135	1,835	0.052291	0.000283	1450786_x_at	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
136	1,392	0.052291	0.000283	1436883_at	Mbtps2	membrane-bound transcription factor peptidase, site 2
137	1,254	0.052355	0.000284	1437017_at	Al480653	expressed sequence Al480653
138	1,889	0.052423	0.000287	1424444_a_at	1600014C10Rik	RIKEN cDNA 1600014C10 gene
139	1,367	0.052423	0.000288	1430165_at	Stk17b	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
140	2,645	0.052466	0.000290	1424560_at	Pstpip1	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1

7.4. Differenziell exprimierte Proteinspots

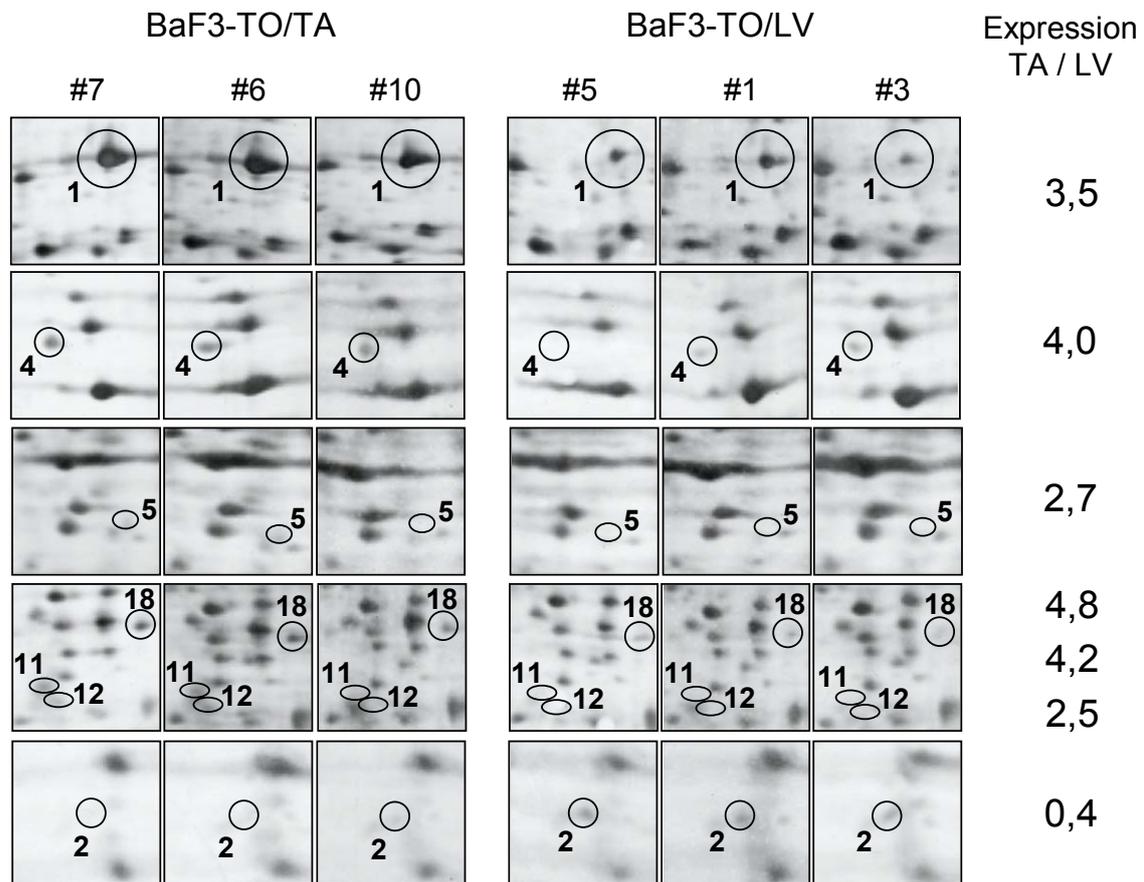


Abb. 7.1: In *ETV6/RUNX1*-exprimierenden BaF3-Zellen wurden mittels 2D-Gelelektrophorese sieben differenziell exprimierte Proteine ermittelt. Proteinspot Nr. 1 wurde als SerpinB1a identifiziert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt zu haben; alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den

Kerstin Hasse

Publikationen

Hasse K (2009). Molekulare Mechanismen bei kindlicher ALL – Vorstellung und Diskussion ungewöhnlicher Fälle. Fortbildungsveranstaltung der Humangenetik der Charité und des Zentrums für Pränataldiagnostik, Kurfürstendamm 199, Prof. Dr. Wegner. (invited talk)

Hasse K, Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Proba J, Ungethuem U, Spang R, Henze G, Seeger K (2007). Gene expression profiling in a TEL/AML1 expressing non-B cell line indicates cell type specific effects of the fusion protein in leukemic blasts of TEL/AML1 positive patients. 23. Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Disease (IACRLRD), 7.-11. September 2007, Freiburg, Germany (poster)

Hasse K, Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Proba J, Ungethuem U, Spang R, Henze G, Seeger K (2006). TEL/AML1 Expression in a Non-B cell line induces a Set of Differentially Expressed Genes, but Points to Cell Type Specific Effects of the Fusion Protein in Leukemic Blasts of TEL/AML1 Positive Patients. 48. Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH), 9.-12. Dezember 2006, Orlando, Florida, USA (poster)

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. G. Henze, dass ich meine Promotion in der Forschungsgruppe der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie und Hämatologie absolvieren konnte.

Die vorliegende Arbeit ist ein Ergebnis der Förderung durch die Deutsche José Carreras Leukämie Stiftung, beantragt von PD Dr. Dr. K. Seeger. Ich danke ihm für die interessante Themenstellung, die großzügige Förderung, sowie sein volles Vertrauen in meine Bearbeitung des Themas, das mir in jeglicher Hinsicht die Möglichkeit bot, mich zu entfalten, sowie Herausforderungen zu begegnen und Verantwortung zu übernehmen.

Ich bedanke mich sehr, sehr herzlich bei Jutta Proba für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung des Projekts, die mir unheimlich viel Spaß gemacht hat und mich auch organisatorisch und emotional sehr positiv beeinflusst hat.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau Dr. Eckert und Frau Dr. Kirschner-Schwabe für ihre anregende und hilfreiche Unterstützung hinsichtlich fachlicher und administrativer Fragestellungen bedanken. Insbesondere Frau Dr. Eckert möchte ich für ihre unermüdliche und freundliche Präsenz, sowie ihre permanente Bereitschaft zu fachlich kompetenten Diskussionen danken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Kolleginnen und Kollegen der Forschungsgruppe der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie und Hämatologie für die nette Zusammenarbeit, die bevorzugt im Bereich der Tagesklinik zu einer sehr angenehmen, offenen Arbeitsatmosphäre geführt hat.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. H. Oschkinat und Prof. Dr. B. Wittig für ihre direkte Bereitschaft zur Begutachtung der Dissertation bedanken.

Diese Dissertation wäre nicht ohne die private Unterstützung folgender Personen realisierbar gewesen:

Ich bedanke mich sehr bei Herr Dr. R. Koechl, Frau Dr. K. Zeilinger und Herr Dr. B. Edemir für ihre spontane und geduldige Bereitschaft zur Korrektur der Arbeit, ihr Engagement und die vielen kompetenten und hilfreichen Ratschläge.

Mein allerherzlichster Dank gilt meiner Freundin Karen Bradschetsl für ihre Initiative zur Fertigstellung meiner Dissertation, ihr professionelles Projektmanagement und die Motivation, ihre unermüdliche Unterstützung bei der Planung und Korrektur und für ihre Freundschaft sowie meinem Freund Mario Loos für seine liebevolle Rundum-Betreuung.

Ich danke meiner Familie, dass sie immer für mich da ist, insbesondere meinen Eltern, die es mir ermöglichten meinen Weg zu gehen.