

Aus dem  
CharitéCentrum 5 für diagnostische und präventive Labormedizin  
Institut für Pathologie  
Campus Charité Mitte  
Direktor: Prof. Dr. med. David Horst

## **HABILITATIONSSCHRIFT**

### **Evolution der *Runt*-Gene mit Fokus auf die Skelettbildung und T-Zellentwicklung**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach molekulare Pathologie,  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Volkhard Seitz**

Eingereicht 10/2020

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachterin: Prof. Dr. Sylvia Hartmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Falko Fend

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 3 -
1.1	Die evolutionäre Entstehung des Skeletts der Chordata.....	- 3 -
1.2	Die evolutionäre Entstehung des adaptiven Immunsystems der Vertebraten .....	- 5 -
1.3	Ein Rekombinationsprozess als Grundlage für die adaptive Immunantwort .....	- 6 -
1.4	Vorteile und Risiken des Rekombinationsprozesses .....	- 8 -
1.5	<i>Runt</i> -Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Knochen und Blutbildung .....	- 9 -
1.6	Zielsetzung.....	- 10 -
2	Eigene Arbeiten .....	- 11 -
2.1	Ein einzelnes Amphioxus und Seeigel <i>Runt</i> -Gen legt nahe, dass <i>Runt</i> -Genduplikationen in der frühen Evolution der Chordata stattfanden .....	- 11 -
2.2	Evolution eines zentralen Gennetzwerks für die Skelettbildung in Chordata .....	- 25 -
2.3	Identifizierung von neuen Skelettbildungs-Zielgenen durch eine umfassende Analyse eines <i>Runx2</i> <sup>-/-</sup> Mausmodells .....	- 40 -
2.4	Eine neue Methode, um Kreuzkontaminationen in zweistufigen PCR NGS-Library Präparationen zu verhindern.....	- 53 -
2.5	Evidenz für eine Rolle von RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor für TCRβ-Genumlagerungen und pathologische Deletionen in der <i>ETV6-RUNX1 ALL</i> .....	- 63 -
3	Diskussion.....	- 81 -
3.1	Evolution der <i>Runt</i> -Transkriptionsfaktoren bei den Chordata .....	- 81 -
3.2	Evolution eines zentralen Gennetzwerks für die Skelettbildung bei den Chordata und eine essentielle Rolle von <i>RUNX2</i> in der Knochenbildung.....	- 82 -
3.3	Die Evolution der <i>Runt</i> -Transkriptionsfaktoren und ihre Rolle in der T-Zellentwicklung.....	- 85 -
3.4	Hinweise für eine Rolle von RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor bei der Entstehung von pathologischen Deletionen .....	- 87 -
4	Zusammenfassung.....	- 89 -
5	Literaturverzeichnis .....	- 91 -
6	Danksagung.....	- 97 -
7	Erklärung.....	- 98 -

## Abkürzungen

Abb	<b>Abbildung</b>
ALL	<b>Akute Lymphatische Leukämie</b>
BCR	B-Zellrezeptor (englisch <b>B-cell receptor</b> )
CDR3	<b>Complementarity Determining Region 3</b>
CML	<b>Chronische Myeloische Leukämie</b>
COL2 $\alpha$ 1	Kollagen Typ II alpha-1 (Englisch: <b>Collagen type II alpha-1</b> )
ETV6	<b>ETS Variant Transcription Factor 6</b>
IGH	Immunglobulin-schwere Kette (Englisch: <b>immunoglobulin heavy chain</b> )
IGL	Immunglobulin-leichte Kette (Englisch: <b>immunoglobulin light chain</b> )
IHH	<b>Indian Hedgehog</b>
SHH	<b>Sonic Hedgehog</b>
Sox	<b>Sex Determining Region Y-related high mobility group box</b>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Englisch <b>polymerase chain reaction</b> )
RAG	Rekombinations-aktivierende Gene (Englisch: <b>recombination activating genes</b> )
RSS	<b>Rekombinations-Signalsequenz</b>
TCR	T-Zellrezeptor (englisch <b>T-cell receptor</b> )
TMEM119	<b>Transmembrane Protein 119</b>
VDR	<b>Vitamin D3 Rezeptor</b>
VLR	<b>Variabler Lymphozyten Rezeptor</b>

## Segmente von Antigenrezeptoren

D	<b>Diversity</b>
J	<b>Joining</b>
V	<b>Variable</b>

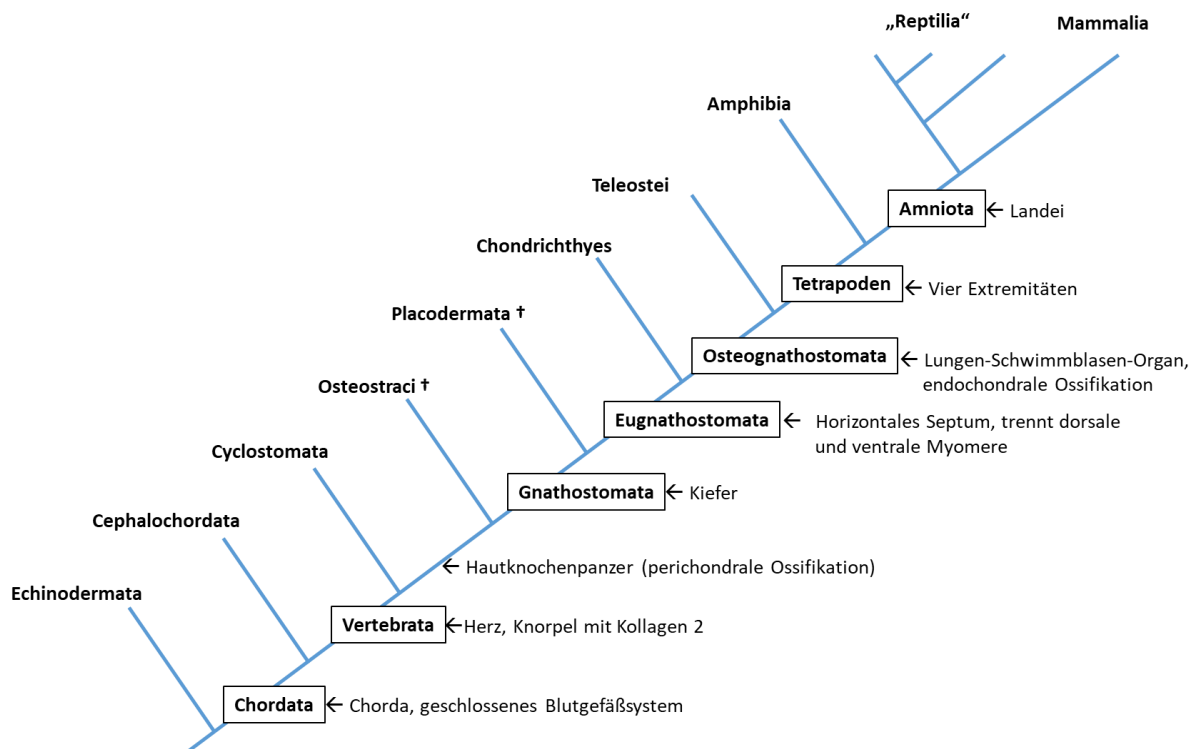
*Nichts in der Geschichte des Lebens ist beständiger als der Wandel. Charles Darwin*

## **1 Einleitung**

Die von Darwin begründete und seitdem ständig weiterentwickelte Evolutionstheorie ist für die Biologie ein grundlegendes Paradigma (1). Alle Resultate biologischer Forschung lassen sich im Lichte der Evolutionsbiologie erörtern (2). In der vorliegenden Arbeit werden Aspekte der Evolution des Skeletts und des Immunsystems beschrieben und evolutionär entstandene „molekulare Schwachpunkte“ identifiziert, welche bei der Entstehung von Erkrankungen, wie Leukämien, beteiligt sein können.

### **1.1 Die evolutionäre Entstehung des Skeletts der Chordata**

Das Skelett ist ein Schlüsselmerkmal der Vertebraten (Wirbeltiere) und lieferte über viele Jahrzehnte eine Grundlage für die vergleichende Anatomie und die Hauptargumente für die Rekonstruktion unserer Stammesgeschichte (3, 4). Bei einer Stammbaumrekonstruktion werden geschlossene Abstammungsgemeinschaften (Monophyletische Gruppen) mit neu erworbenen Merkmalen (Apomorphien) begründet (5). Wie in Abb. 1 dargestellt, ist eine Apomorphie der Chordata (Chordatiere) die „Chorda“, ein elastisches Achsenskelett (6). Bei den Vertebraten wird aufgrund der Entwicklung des Skeletts die Chorda zurückgebildet und diese ist nur noch als Rest in den Bandscheiben zu finden (6). Eine Apomorphie der Vertebraten ist das Herz, und die Gnathostomata (Kiefermäuler) besitzen als evolutionäre Neuheit einen Kiefer mit Zähnen (2, 7). Die Eugnathostomata besitzen als ein neues Merkmal ein horizontales Septum, welches die dorsalen und ventralen Myomere trennt (8). In der Evolution der Stammart der Osteognathostomata (Knochenkieferrmäuler) hat sich ein Lungen-Schwimmblasen-Organ neu entwickelt und die Tetrapoda (Vierfüßer) zeichnen sich durch 4 seitlich gestellte Extremitäten aus (2, 7). Eine Apomorphie der Amniota ist das „Landei“, wodurch ein vollständiges Leben an Land möglich wurde (9).



**Abb. 1:** Stammbaum der Chordata, welcher für die jeweilige Stammart der wichtigsten Taxa durch neu entstandene Merkmale (Apomorphien) begründet ist (2, 7). Da die Reptilien keine geschlossene Abstammungsgemeinschaft darstellen, wurden sie in Anführungszeichen gesetzt. †: Nur Fossilien vorhanden. (Abbildung selbst erstellt).

Bei der stammesgeschichtlichen Rekonstruktion der Vertebraten war lange unklar, wie die Cyclostomata (Rundmäuler) einzuordnen sind (10). Die Cyclostomata umfassen die Neunaugen (*Petromyzon*) und die Schleimaale (*Myxine*). Im Gegensatz zum Neunauge mit dorsalen Wirbelelementen sind beim adulten Schleimaal keine Wirbel vorhanden (10). Daher stellte sich die Frage, ob eine Zuordnung der Schleimaale zu den Vertebraten richtig ist. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass bei Schleimaalen die Wirbelbildung embryonal noch angelegt ist und sehr wahrscheinlich die Wirbelbildung sekundär zurückgebildet wurde (11). Passend zu diesen Befunden betätigten auch molekulare Analysen, dass es sich bei den Cyclostomata um eine monophyletische Gruppe handelt und daher die Zuordnung der Schleimaale zu den Vertebraten gut begründet ist (12, 13).

In der frühen Stammesgeschichte der Vertebraten (rezente Vertreter Cyclostomata) war Knorpel und noch kein Knochen vorhanden (14). Bei den Matrixproteinen des Skeletts der Cyclostomata handelt es sich neben speziesspezifischen Proteinen um Kollagen Typ II alpha-1 (COL2 $\alpha$ 1), welches auch das charakteristische Matrixprotein des Knorpels der Gnathostomata ist (15, 16).

Eine Besonderheit der rezenten Chondrichthyes als Vertreter der Gnathostomata ist, dass in ihrer Haut Placoidschuppen vorkommen, welche in ihrem Aufbau homologe Strukturen zu den Zähnen im Kiefer aufweisen und daher auch als „Hautzähne“ bezeichnet werden (17, 18). Bezieht man Fossilien in die Stammbaumrekonstruktion ein, so zeigt sich, dass bereits die kieferlose Schwestergruppe der Gnathostomata, die Osteostraci, zahnähnliche Strukturen in der Haut besaßen (19, 20). Sie hatten auch einen Hautknochenpanzer, welcher durch perichondrale Ossifikation gebildet wurde (19, 20). Bei dieser „Verknöcherung von außen“ sondern sich von der Knorpelhaut (Perichondrium) Osteoblasten ab, welche sich ringförmig um das Knorpelmodell anlagern (4). Weiterhin gab es einen durch perichondrale Ossifikation gebildeten Hautknochenpanzer und teilweise auch zahnähnliche Strukturen im Exoskelett der ausgestorbenen Placodermata (Plattenhäuter), welche einen Kiefer besaßen und daher zu den Gnathostomata gehören (21, 22).

Erst später in der Stammart der Osteognathostomata ist die endochondrale Ossifikation entstanden (23). Bei der endochondralen Ossifikation, „Verknöcherung von innen her“, wachsen in das Knorpelgewebe Blutgefäße ein und es kommt zu einem Knorpelabbau durch Chondroklasten und einem Knochenaufbau durch Osteoblasten (24).

Das Skelett hat nicht nur wichtige Funktionen für den Bewegungsapparat, sondern auch eine Schutzfunktion bei lebenswichtigen Prozessen wie der Blutbildung. In der frühen Stammesgeschichte der Vertebraten fand die Blutbildung außerhalb vom Skelett in dafür geeigneten Mikroumgebungen wie Niere, Milz und Leber statt (25). Doch beim Landgang der Tetrapoda verlagerte sich die Blutbildung in den Knochen (26). Wahrscheinlich war der Selektionsdruck hierfür, dass das umhüllende Skelett einen besseren Schutz der hämatopoetischen Stammzellen vor der stärkeren UV-Strahlenbelastung an Land gewährleisten konnte (27).

## **1.2 Die evolutionäre Entstehung des adaptiven Immunsystems der Vertebraten**

Alle tierischen Vielzeller (Metazoa) besitzen ein angeborenes Immunsystem, das auch als innates Immunsystem bezeichnet wird (28, 29). Ein wichtiges Merkmal dieses innaten Immunsystems ist seine Fähigkeit, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ (z. B. Bestandteilen der bakteriellen Zellwand) zu unterscheiden (29).

Gemeinsame Oberflächenstrukturen von eindringenden Mikroorganismen (z.B. Lipopolysaccharide) können vom innaten Immunsystem durch Mustererkennungs-Moleküle erkannt werden (29). So können Infektionserreger bekämpft werden, ohne dass der Organismus vorher mit dem Erreger Kontakt hatte (29). Die Anzahl der unterschiedlichen Pathogene, die durch das ursprüngliche Immunsystem erfasst werden kann, ist jedoch sehr beschränkt.

Eine wesentliche Neuerung in der Evolution des Immunsystems war die Bildung von Immunzellen, die ein fast unendlich großes Repertoire von potenziellen Pathogenen erkennen können (30). Darüber hinaus ist dieses weiterentwickelte Immunsystem fähig zu lernen, d. h. sich an neue Abwehrherausforderungen optimal anzupassen (zu adaptieren) (30).

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte zeigen, dass bereits in der Stammart der Vertebraten bestimmte Elemente des adaptiven Immunsystems vorhanden waren, wie eine Dichotomie von T-Zell-artigen Zellen, welche in einer dem Thymus ähnlichen Struktur reifen und B-Zell-artigen Zellen, welche ihre Antigenrezeptoren sekretieren können (31). Allerdings hat sich bei den Cyclostomata und den Gnathostomata auf Basis dieser gemeinsamen Merkmale ein unterschiedliches adaptives Immunsystem entwickelt. Ein Überblick über das Immunsystem der Cyclostomata, welche drei Typen von variablen Lymphozyten Rezeptoren (VLRs), besitzen wird durch Boehm und Kollegen gegeben (31). Der Fokus dieser Habilitation liegt auf dem adaptiven Immunsystem der Gnathostomata, welches vor etwa 500 Millionen Jahren entstanden ist (30).

### **1.3 Ein Rekombinationsprozess als Grundlage für die adaptive Immunantwort**

Wichtigste Komponenten des adaptiven Immunsystems der Gnathostomata sind die B-Zellen und die T-Zellen (30). Während sich die T-Zellen im Thymus entwickeln, entstehen die B-Zellen bei Säugetieren im Knochenmark (engl. Bone marrow, daher B-Zellen) (32).

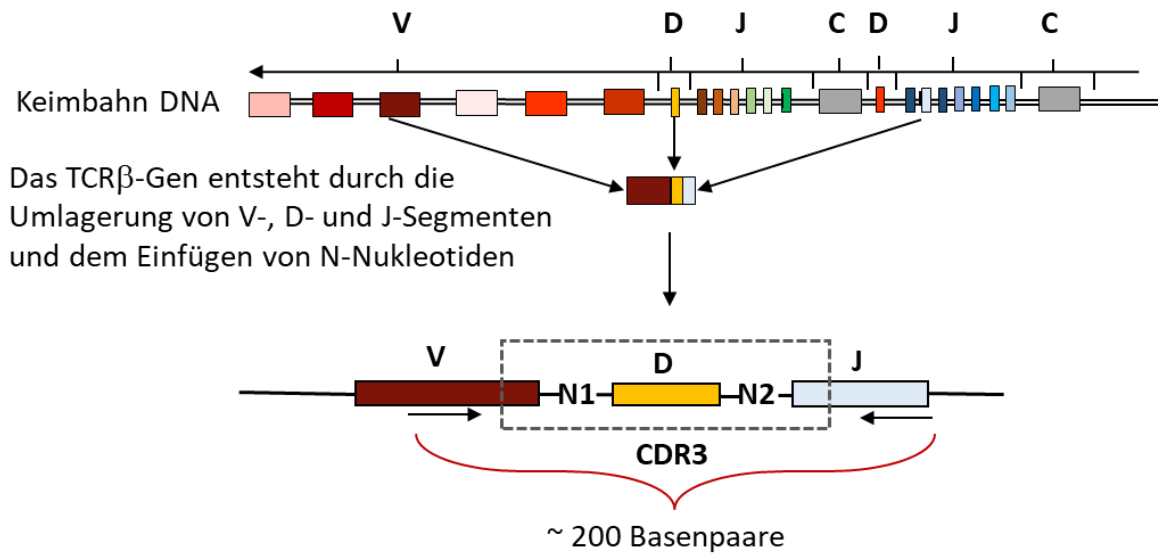
Es war zunächst ein Rätsel, wie die große Rezeptorvielfalt der B- und T-Zellen des Immunsystems (potenzielles Erkennen von über zehn Milliarden verschiedenen „Fremd“-Stoffen) zustande kommt, denn diese Rezeptoren sind nicht in der Keimbahn vorhanden, sondern werden in der B- und T-Zellentwicklung neu gebildet (32).

Hierfür ist in der Evolution der Vertebraten ein Mechanismus entstanden, welcher mit einer Lotterie vergleichbar ist, bei der durch eine zufällige Auswahl verschiedener Elemente eine sehr große Zahl von Kombinationen möglich wird. So entsteht durch Umlagerung verschiedener Gensegmente unter Herausschneiden der dazwischenliegenden DNA-Abschnitte während der B- und T-Zellentwicklung eine fast unendliche Vielfalt von Rezeptor-Genen (30). Diese ermöglichen es den B-Zellen und T-Zellen, auf eine große Zahl von Fremdstoffen zu reagieren. Die Neubildung von B- und T-Zellen mit den entsprechenden Umlagerungen von B-Zellrezeptoren (BCR) und T-Zellrezeptoren (TCR) findet im Körper ständig und unabhängig davon statt, ob „Fremdes“ in den Körper eindringt oder nicht (32).

Alle BCRs und TCRs werden durch 2 Proteinuntereinheiten gebildet (33). TCRs bestehen entweder aus einer  $\gamma$  und  $\delta$  Kette oder aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Kette und BCRs aus einer „schweren Kette“ (Englisch: immunoglobulin heavy chain, IgH) und einer leichten Kette (Englisch: immunoglobulin light chain, IgL ( $\kappa$  oder  $\lambda$ )). Bei der Umlagerung der BCRs und TCRs werden immer **V**ariable (V) und **J**oining (J) Segmente verwendet. Zusätzlich zu den V- und J-Segmenten werden bei TCR $\beta$ , TCR $\delta$  und IgH **D**iversity (D) Segmente für die Rekombination benutzt (34).

Die enzymatischen Schlüsselproteine für die V(D)J Rekombination sind die „**R**ecombination **A**ctivating **G**enes“ (RAG) 1 und 2 (35). Der RAG-Komplex bindet beim Umlagerungsprozess an spezifische Sequenzmotive, die sich an den Enden der V(D)J-Gensegmenten befinden. Diese **R**ekombinations-**S**ignalsequenzen (RSS) bestehen aus einer konservierten Heptamer (CACAGTG) und Nonamer-Sequenz (ACAAAAACC), welche durch einen Spacer mit einer Länge von 12 oder 23 Basenpaaren (bp) getrennt ist (36). Zu Beginn wird bei diesem Umlagerungsprozess an der Heptamer-Sequenz ein DNA-Nick eingefügt und nach Trennung der DNA-Abschnitte werden die Gensegmente wieder durch den „non homologous endjoining“ Signalweg verknüpft, wobei im Verknüpfungsbereich kurze zufällige Nukleotid-Sequenzen (N-Nukleotide) eingefügt werden (34). Hierbei entstehen hochspezifische Rezeptor-Gene, welche als „genetischer Fingerabdruck“ einer B- bzw. T-Zelle gesehen werden können. Der V-N1-D-N2-J-Abschnitt kodiert für Aminosäuren, die an der Antigenbindung beteiligt sind und wird als **C**omplementarity **D**etermining **R**egion 3 (CDR3) bezeichnet (34).





**Abb. 2:** Schematische Darstellung des humanen TCR $\beta$ -Lokus und einer TCR $\beta$ -Genumlagerung, (Abbildung selbst erstellt).

#### 1.4 Vorteile und Risiken des Rekombinationsprozesses

Der Rekombinationsmechanismus hat den Vorteil, dass eine enorme Vielfalt von Strukturen zum Erkennen und zur Abwehr von Fremdstoffen bei B- und T-Zellen gebildet werden kann (32). Doch der Nachteil ist, dass bei den komplexen Abläufen zur Neukombination von Abschnitten der Erbinformation (siehe Abb. 2) Fehler auftreten können (37). Die meisten dieser Fehler kann unser Organismus erkennen und es kommt zum Absterben der betroffenen Zellen. In einem sehr kleinen Teil der fehlerhaften Immunzellen versagt dieser Eliminierungsmechanismus, sie entziehen sich jeder Kontrolle und ohne effektive Behandlung kommt es schließlich zum Versagen lebenswichtiger Organfunktionen und zum Tod (37).

Aus den Zellarten des Immunsystems können sich Leukämien oder Lymphknotenkrebs (Lymphome) entwickeln. Lymphome entstehen im sogenannten peripheren lymphatischen System (z. B. in den Lymphknoten), während sich Leukämien überwiegend im Knochenmark bilden und im Blut ausbreiten (38).

Leukämien und Lymphome kommen nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei anderen Gnathostomata vor (39-41). Dies lässt den Schluss zu, dass seit der Entstehung des adaptiven Immunsystems Fehler bei molekularen Prozessen in Kauf genommen wurden, die zum Tod einzelner Individuen führen, solange die Vorteile des adaptiven Immunsystems für die jeweilige Art größer als die Risiken sind (41).

## 1.5 *Runt*-Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Knochen und Blutbildung

*Runt*-Transkriptionsfaktoren besitzen eine evolutionär konservierte DNA-bindende *Runt*-Domäne und kommen sowohl bei Vertebraten als auch bei Insekten vor (42). Der Name „*Runt*“ leitet sich daraus ab, dass bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ein *Runt*-Gen-Knockout zu einem „kümmerlichen“ Phänotyp führt (Englisch *Runt* = Kümmerling) (43).

Bei den 3 *Runt*-Genen der Säugetiere (*RUNX1-3*) ist *RUNX1* essentiell für die Bildung der Blutstammzellen und auch bei der B- und T-Zelldifferenzierung beteiligt (44-47). *Runx1* gehört zu den am häufigsten mutierten Genen in malignen hämatologischen Erkrankungen und diese können zu einem direkten Verlust der *RUNX1*-Funktion führen oder zu einem dominant-negativen Effekt (48, 49). Es gibt weiterhin über 50 verschiedene Translokationen, bei denen *Runx1* beteiligt ist (49). Die häufigste dieser Translokationen, t(12;21), kommt in etwa 20% der kindlichen Akuten Lymphatischen Leukämien (ALL) vor (50, 51). Es entsteht ein *ETV6-RUNX1* Fusionsgen, welches die N-terminale, nicht DNA-bindende Domäne von *ETV6* (12p13) sowie fast das gesamte *RUNX1*-Gen (21q22) inklusive seiner DNA-bindenden Domäne umfasst (52). In diesem Fall bleibt daher die DNA-bindende Funktion von *RUNX1* erhalten, doch diese ist dereguliert (53).

Interessanterweise zeigte eine neuere Arbeit, dass *RUNX1* nicht nur als Transkriptionsfaktor fungiert, sondern auch während der humanen TCR $\delta$ -Genumlagerung eine Rolle als Rekombinase-Kofaktor spielt (54). Hierbei beeinflusst *RUNX1* die Bindung von *RAG1* an einer *RUNX1*-Bindungsstelle, welche mit dem Heptamer der RSS überlappt (54).

*RUNX2* ist essentiell für die Knochenbildung, denn homozygote *Runx2* defiziente Mäuse können keine Knochen bilden (55). Beim Menschen wird durch einen heterozygoten Verlust von *RUNX2* die Cleidocraniale Dysplasie verursacht, welche vor allem zu Störungen der Knochenentwicklung an Schädel und Schlüsselbein führt (56). Neben fehlenden bzw. zu kleinen Schlüsselbeinen („cleido“) und Defekten bei der Verknöcherung des Schädels („cranio“) kommt es auch zu überzähligen Zähnen und Kleinwuchs (56). Bei heterozygoten *Runx2* defizienten Mäusen entsteht ein korrespondierender Phänotyp (55).

*RUNX3* ist in der Entwicklung von T-Zellen im Thymus und der Differenzierung von verschiedenen Zelltypen des Immunsystems involviert (57-59). Weiterhin spielt *RUNX3* bei der

Regulation der epithelialen Homeostase im Verdauungstrakt, der Differenzierung von Neuronen und von Chondrozyten eine wichtige Rolle (60-62).

## **1.6 Zielsetzung**

Das Hauptziel dieser Habilitationsschrift war, die Evolution der *Runt*-Gene in der Stammesgeschichte der Chordata zu rekonstruieren und die *Runt*-Genfunktion bei der Skelettbildung und T-Zellentwicklung besser zu verstehen. Weiterhin wurden die Risiken eines verbesserten Immunsystems durch Genumlagerungen bei den Vertebraten betrachtet, insbesondere bei der Entstehung von pathologischen Deletionen bei der ALL mit einer *ETV6-RUNX1* Translokation.

## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Ein einzelnes Amphioxus und Seeigel *Runt*-Gen legt nahe, dass *Runt*-Genduplikationen in der frühen Evolution der Chordata stattfanden

**Einführung:** Ein Hauptziel dieser Habilitationsschrift war, die Evolution der *Runt*-Gene in der Stammesgeschichte der Chordata zu analysieren. In dieser Arbeit wurde das Vorkommen von *Runt*-Genen in Lanzettfischen (Synonym: *Amphioxus*, *Branchiostoma lanceolatum*, *Branchiostoma floridae*) und Seeigel Embryonen (*Strongylocentrotus purpuratus*) erforscht. Es konnte rekonstruiert werden, dass nur ein *Runt*-Gen in der Stammart der Chordata vorhanden war und dieses ein komplexes Expressionsmuster hatte (63). Aufbauend auf dieser Analyse wurde in der nächsten Arbeit die Evolution der *Runt*-Gene bei charakteristischen Vertretern der Vertebraten untersucht (64).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Stricker S, Poustka AJ, Wiecha U, Stiege A, Hecht J, Panopoulou G, Vilcinskas A, Mundlos S, **Seitz V**. A single amphioxus and sea urchin runt-gene suggests that runt-gene duplications occurred in early chordate evolution. Dev Comp Immunol. 2003;27(8):673-84.

[https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(03\)00037-5](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00037-5)

**Übersetzung durch den Autor:** „*Runt*-homologe Moleküle sind durch ihre DNA-bindende *Runt*-Domäne charakterisiert, welche innerhalb der Bilateria hochkonserviert ist. Die drei *Runt*-Gene der Mammalia sind Masterregulatoren der Knorpel- und Knochenbildung sowie der Hämatopoese. Historisch sind diese Merkmale in der Evolution der Craniota entstanden und vielleicht durch Duplikationen des *Runt*-Gens begünstigt worden. Das Ziel dieser Untersuchung war es daher zu erforschen, wie viele *Runt*-Gene in der Stammart der Chordate vorhanden waren, indem die *Runt*-Genanzahl in dem wahrscheinlich nächsten lebenden Verwandten der Craniota – Amphioxus – analysiert wurde. Um mehr Erkenntnisse über die mögliche Rolle von *Runt*-Genen in der frühen Evolution der Chordata zu gewinnen, haben wir die Zahl der *Runt*-Gene in Seeigeln bestimmt und das *Runt*-Genexpressionsmuster in dieser Spezies analysiert.

Unsere Ergebnisse zeigen die Anwesenheit eines einzelnen *Runt*-Gens in Amphioxus und im Seeigel, was sehr wahrscheinlich macht, dass die Stammart der Chordata nur ein *Runt*-Gen besaß. Dies legt nahe, dass *Runt*-Genduplikationen später in der Phylogenie der Chordata

stattgefunden haben und möglicherweise mit der Evolution von Merkmalen wie der Hämatopoese, sowie der Knorpel- und Knochenentwicklung assoziiert sind.

In Seeigel Embryonen umfasst die *Runt*-Genexpression Zellen mit einer endodermalen, mesodermalen und ektodermalen Herkunft. Dieses komplexe Expressionsmuster könnte die vielseitigen Rollen der *Runt*-Gene bei den Mammalia widerspiegeln. Ein starkes *Runt*-Signal im gastrointestinalen Trakt vom Seeigel passt zur *Runt*-Genexpression im Darm von Nematoden und dem murinen gastrointestinalen Trakt und scheint eine der phylogenetisch ursprünglichen *Runt*-Expressionsdomänen zu sein.“





























## 2.2 Evolution eines zentralen Gennetzwerks für die Skelettbildung in Chordata

**Einführung:** In der vorangegangenen Publikation konnte rekonstruiert werden, dass in der Stammart der Chordata nur ein *Runt*-Gen vorhanden war (63). Als Weiterführung dieser Arbeit wurde erforscht, dass in der frühen Evolution der Vertebraten durch Duplikationen des *Runt*-Lokus 3 *Runt*-Gene entstanden sind (64). Diese 3 *Runt*-Gene (*RUNX1*, 2 und 3) haben zahlreiche Funktionen, z.B. in der Blutbildung und der Differenzierung von B- und T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Rolle von *Runt*-Genen in der Skelettbildung. In der darauffolgenden Publikation wird exemplarisch ein essentielles Gen für die Skelettbildung (*RUNX2*) genauer untersucht (65).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hecht J, Stricker S, Wiecha U, Stiege A, Panopoulou G, Podsiadlowski L, Poustka AJ, Dieterich C, Ehrich S, J. Suvorova, Mundlos S, **Seitz V**. Evolution of a core gene network for skeletogenesis in chordates. PLoS Genet. 2008;4(3):e1000025.

<https://doi.org/DOI:10.1371/journal.pgen.1000025>

**Übersetzung durch den Autor:** „Das Skelett ist eines der wichtigsten Merkmale für die Rekonstruktion der Vertebraten Phylogenie, doch es gibt nur wenige Daten, um seine molekulare Entstehung zu verstehen. Bei den Säugetieren sind *Runt*-Gene zentrale Regulatoren der Skelettbildung. Für *Runx2* wurde gezeigt, dass es essentiell für die Differenzierung von Osteoblasten, die Zahnentwicklung und die Knochenbildung ist. Sowohl *Runx2* als auch *Runx3* sind essentiell für die Reifung von Chondrozyten. Weiterhin reguliert *Runx2* direkt die *Indian Hedgehog* Expression, ein Masterregulator für Skelettentwicklung. Um die Korrelation der *Runt*-Gen Evolution und der Entstehung von Knorpel und Knochen in Vertebraten aufzuklären, klonierten wir die *Runt*-Gene vom Schleimaal als Vertreter für Kieferlose Fische (*MgRunxA*, *MgRunxB*) und vom Katzenhai als Vertreter der Knorpelfische mit einem Kiefer (*ScRunx1-3*). Nach unserer phylogenetischen Rekonstruktion besaß die Stammart der Chordata ein einzelnes *Runt*-Gen und danach erfolgten Duplikationen des *Runt*-Lokus während der frühen Vertebraten-Evolution. Eine quantitative PCR zeigte, dass alle neu isolierten *Runt*-Gene im Knorpel exprimiert waren. *In-situ*-Hybridisierung bestätigte eine hohe *MgRunxA* Expression im harten Knorpel vom Schleimaal. Im Katzenhai waren *ScRunx2* und *ScRunx3* im embryonalen Knorpelgewebe exprimiert, während alle 3 *Runt*-Gene in den Zähnen

und Placoidschuppen detektiert wurden. In Cephalochordata (Lanzettfischchen) wurden *Runt*, *Hedgehog* und *SoxE* stark in den Kiemenspangen exprimiert und eine Expression von *Runt* und *Hedgehog* wurde sowohl in endo- als auch in ektodermalen Zellen gefunden. Weiterhin zeigen wir, dass das Runt-Protein des Lanzettfischchens die Runt-Bindungsstellen im *Hedgehog*-Promoter des Lanzettfischchens bindet und seine Aktivität reguliert. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass *Runt* und *Hedgehog* Bestandteile eines Gennetzwerks für Knorpelbildung waren, welches schon in den Kiemenspangen vom gemeinsamen Vorfahren der Cephalochordata und der Vertebraten aktiv war und sich diversifizierte, nachdem *Runt*-Duplikationen während der Vertebraten-Evolution erfolgt waren. Die Ähnlichkeiten in den Expressionsmustern der *Runt*-Gene unterstützen die Sichtweise, dass Zähne und Placoidschuppen aus einem homologen Entwicklungsmodul evolviert sind.“































### 2.3 Identifizierung von neuen Skelettbildungs-Zielgenen durch eine umfassende Analyse eines *Runx2*<sup>-/-</sup> Mausmodells

**Einführung:** In den zwei vorangegangenen Publikationen wurde die Evolution der *Runt*-Gene analysiert und gezeigt, dass sie schon vor über 500 Millionen Jahren in zentrale Gennetzwerke für die Skelettbildung involviert waren (63, 64). In dieser Arbeit ging es darum, die *Runt*-Gen Funktion bei der Skelettbildung besser zu verstehen. Hierzu wurde die Rolle von *Runx2* in der Knorpel- und Knochenbildung in einem *Runx2*<sup>-/-</sup> Mausmodell im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Auf Basis einer differentiellen Genexpressionsanalyse und *in-situ*-Hybridisierungen konnten neue *Runx2* Target-Gene entdeckt werden (65).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hecht J\*, Seitz V\*, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, Dieterich C, Kornak U, Wilkening U, Brieske N, Zwingman C, Kidess A, Stricker S, Mundlos S. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a *Runx2*<sup>-/-</sup> mouse model. Gene Expr Patterns. 2007;7(1-2):102-12.

<https://doi.org/DOI:10.1016/j.modgep.2006.05.014>

(\*Geteilte Erstautorenschaft)

**Übersetzung durch den Autor:** „*Runx2* ist ein essentieller Faktor für die Skelettbildung und ein heterozygoter Verlust verursacht die Cleidocraniale Dysplasie beim Menschen und einen korrespondierenden Phänotyp in der Maus. Homozygote *Runx2* defiziente Mäuse haben keinen hypertrophen Knorpel und keine Knochen. Wir verglichen die Expressionsprofile von E14.5 Wildtyp und *Runx2*<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Oberarmknochen, um neue Transkripte zu identifizieren, welche potenziell an der Knorpel- und Knochenbildung beteiligt sind. Einundsiebzig differenzielle Gene wurden durch zwei unabhängige Hybridisierungen von Oligonukleotid-Microarrays und quantitative RT-PCR-Experimente identifiziert. Eine Analyse der Genontologie zeigte eine Anreicherung der differentiell regulierten Gene für Annotationen zu Begriffen wie extrazellulär, Skelettentwicklung und Knochenbildung. *In-situ*-Hybridisierungen bei Sektionen von E15.5 Gliedmaßen wurden für alle 71 differentiell regulierten Gene durchgeführt. Für 54 Gene konnten schlüssige Ergebnisse erhalten werden und sie alle zeigten eine Expression im Skelett. Ko-Expression mit *Runx2* wurde für 44 Gene gezeigt. Während 41 der 71 differentiell exprimierten Gene eine bekannte Rolle im Knochen und Knorpel hatten, identifizierten wir 21 bekannte Gene, welche bisher nicht mit der

Skelettentwicklung in Zusammenhang gebracht wurden, und 9 völlig neue Transkripte. Eine Expression im sich entwickelnden Skelett wurde für 21 dieser Gene gezeigt.“

























## 2.4 Eine neue Methode, um Kreuzkontaminationen in zweistufigen PCR NGS-Library Präparationen zu verhindern

**Einführung:** *Runt*-Gene spielen nicht nur bei der Skelettbildung, sondern auch bei der Blutbildung und der Entwicklung der T-Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle. Durch die Entwicklung der Hochdurchsatzsequenzierung wurde es möglich, die enorm große Anzahl verschiedener T-Zellrezeptoren (TCRs) zu analysieren. In dieser Publikation wird eine effiziente und zuverlässige Methodik zur Hochdurchsatzanalyse von TCRs beschrieben (66). Diese Methodik wurde in der darauffolgenden Publikation eingesetzt, um den Einfluss von *Runx1* auf die TCR $\beta$ -Genumlagerungen zu erforschen (67).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von **Seitz V**, Schaper S, Droge A, Lenze D, Hummel M, Hennig S. A new method to prevent carry-over contaminations in two-step PCR NGS library preparations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(20):e135.

<https://doi.org/DOI:10.1093/nar/gkv694>

**Übersetzung durch den Autor:** „Zweistufige PCRs sind ein effizienter und gut etablierter Weg, um Amplikon-Libraries für Hochdurchsatzsequenzierungen herzustellen. Doch es gibt ein hohes Risiko von Kreuzkontamination durch Verschleppung von Amplikons von der ersten zur zweiten Amplifikationsrunde, welche möglicherweise zu einer starken Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann. Hier beschreiben wir eine neue Methode, welche geeignet ist, Kreuzkontaminationen zu verhindern und/oder zu detektieren, durch die Einführung einer K-Box, welche 3 synergistisch wirkende kurze Sequenzelemente umfasst. Unsere K-Boxen bestehen aus (i) K1-Sequenzen für die Unterdrückung von Kontaminationen, (ii) K2-Sequenzen zur Detektion von potenziellen Restkontaminationen und (iii) S-Sequenzen, welche als Separatoren wirken, um einen Amplifikationsbias zu verhindern. Um die Effektivität der Methodik zu zeigen, analysierten wir zweistufige PCR NGS-Libraries, welche aus einem Multiplex-PCR-System für die Ermittlung von T-Zellrezeptor-beta-Genumlagerungen stammten. Wir benutzen dieses System, da es von hoher klinischer Relevanz ist und durch sehr geringe Mengen von Kreuzkontaminationen beeinträchtigt werden kann. Es wurde durch die Sequenziefenanalyse der PCR-Produkte gezeigt, dass Spike-In Kontaminationen durch die K-Box effektiv blockiert werden, sogar bei hohen Raten. Daher empfehlen wir die Implementation der K-Box in zweistufige PCR basierte NGS-Systeme, für die Forschung und diagnostische Anwendungen, welche eine hohe Sensitivität und Genauigkeit erfordern.“





















## 2.5 Evidenz für eine Rolle von RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor für TCR $\beta$ -Genumlagerungen und pathologische Deletionen in der *ETV6-RUNX1* ALL

**Einführung:** Basierend auf der Entwicklung einer zuverlässigen Methodik zur Hochdurchsatzsequenzierung von TCR $\beta$ -Genumlagerungen wurde in dieser Arbeit die Rolle von *Runx1* bei der T-Zellentwicklung in einem *Runx1*-Knockout Mausmodell untersucht (66, 67). Es konnte ein Modell erstellt werden, dass RUNX1 bei den Mammalia nicht nur als Transkriptionsfaktor bei der T-Zellentwicklung beteiligt ist, sondern auch eine zweite Rolle als Rekombinase-Kofaktor hat. RUNX1 ist demnach als Rekombinase-Kofaktor beim physiologischen Deletionsprozess während der Umlagerung des TCR beteiligt sowie bei der Entstehung von pathologischen Deletionen bei der ALL mit einer *ETV6-RUNX1* Translokation. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie eine evolutionäre Verbesserung des Immunsystems durch den TCR-Umlagerungsmechanismus auch neue Risiken mit sich bringt. Durch einen fehlgeleiteten Umlagerungsmechanismus können Leukämien entstehen.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von **Seitz V\***, Kleo K\*, Droge A, Schaper S, Elezkurtaj S, Bedjaoui N, Dimitrova L, Sommerfeld A, Berg E, von der Wall E, Müller U, Joosten M, Lenze D, Heimesaat MM, Baldus C, Zinser C, Cieslak A, Macintyre E, Stocking C, Hennig S, Hummel M. Evidence for a role of RUNX1 as recombinase cofactor for TCRbeta rearrangements and pathological deletions in *ETV6-RUNX1* ALL. Sci Rep. 2020;10(1):10024.

<https://doi.org/DOI:10.1038/s41598-020-65744-0>

(\*Geteilte Erstautorenschaft)

**Übersetzung durch den Autor:** „T-Zellrezeptor (TCR)  $\beta$  Umlagerungen repräsentieren einen komplexen und streng geregelten molekularen Mechanismus, welcher das Ausschneiden (physiologische Deletion) und Rekombination von DNA während der T-Zellentwicklung umfasst. RUNX1 ist als Transkriptionsfaktor wichtig für die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen. Interessanterweise wurde für RUNX1 in einer neueren Publikation auch eine Rolle als Rekombinase-Kofaktor bei der TCR $\delta$ -Umlagerung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Runx1* auf TCR $\beta$ -Umlagerungen in einem *Runx1*-Knockout Mausmodell untersucht. Es wurde mithilfe von TCR $\beta$ -Hochdurchsatzsequenzierung, Immunhistologie und Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt, dass *Runx1* an die Initiationsstelle der TCR $\beta$ -Umlagerungen bindet und ein homozygoter *Runx1*-Knockout zu einer starken Reduktion der T-Zellanzahl und zu spezifischen strukturellen Änderungen in den



TCR $\beta$ -Umlagerungen führt. Im Gegensatz dazu zeigte eine heterozygote *Runx1*-Inaktivierung kaum einen Einfluss auf die T-Zellen.

Um die Ergebnisse aus dem Mausmodell mit der Situation in der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) zu vergleichen, wurden TCR $\beta$ -Umlagerungen in T-ALL Proben mit heterozygoten RUNX1-Mutationen untersucht. Vergleichbar zum heterozygoten *Runx1*-Knockout im Mausmodell zeigten sich bei den T-ALL TCR $\beta$ -Umlagerungen in RUNX1-mutierten Fällen versus Kontrollen ohne eine RUNX1-Mutation keine signifikanten Unterschiede.

Weiterhin wurden DNA-Bindungsstellen für RUNX1 an den Rändern von rekurrenten Deletionen in der ALL mit einer *ETV6-RUNX1* Translokation untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Anreicherung von RUNX1-Bindungsmotiven an den Deletionsrändern im Vergleich zu Kontrollen aus dem Gesamtgenom. Dies führte zu einem Modell, dass RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor bei der Entstehung von pathologischen Deletionen beteiligt ist.

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor sowohl bei physiologischen Deletionen (TCR-Umlagerung) als auch bei pathologischen Deletionen (ALL mit einer *ETV6-RUNX1* Translokation) beteiligt ist.“





































### 3 Diskussion

Unser Körper ist durch seine evolutionäre Vergangenheit geprägt, welche viele Millionen Jahre umfasst (1, 68). Daher kann für die meisten Aspekte der menschlichen Biologie ein evolutionärer Blickwinkel zu einem besseren Verständnis beitragen. Um die Evolution der Vertebraten zu rekonstruieren, wurden, historisch gesehen, hauptsächlich Skelettmerkmale verwendet (4). Doch über die molekulare Evolution des Skeletts oder des Immunsystems war wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde die Frage gestellt, was den Menschen bei diesen Merkmalen auf molekularer Ebene mit dem Lanzettfischchen (*Branchiostoma lanceolatum*, *Branchiostoma floridae*), dem Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*) und einem Schleimaal (*Myxine glutinosa*) verbindet. Der Fokus lag dabei auf den *Runt*-Transkriptionsfaktoren.

#### 3.1 Evolution der *Runt*-Transkriptionsfaktoren bei den Chordata

Wir konnten rekonstruieren, dass in der Stammart der Chordata nur ein einzelnes *Runt*-Gen vorhanden war (63, 64). Dies passt zu Analysen, dass die Genome von Fadenwürmern (Nematoda, *Caenorhabditis elegans*), Ringelwürmern (Annelida, *Capitella teleta*), sowie von vielzelligen Tieren (Metazoa) mit sehr ursprünglichen Merkmalen, den Nesseltieren (Cnidaria, *Nematostella vectensis*) und Schwämmen (Porifera, *Amphimedon queenslandica*, *Oscarella carmela*) nur ein *Runt*-Gen beherbergen (69-71). Demnach besaß auch die Stammart der Metazoa nur ein *Runt*-Gen (69). In der Evolution der Metazoa kam es mehrfach unabhängig zu Duplikationen von *Runt*-Genen, da sowohl im Genom der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) als auch bei den Vertebraten mehrere *Runt*-Gene vorkommen (43, 64, 72, 73).

Seit vor 50 Jahren Susumu Ohno postulierte, dass die Genome von Säugetieren und Vögeln durch zwei Genomduplikationen entstanden sind, wurde kontrovers diskutiert, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Anzahl Genomduplikationen in der Evolution der Vertebraten stattfanden (74-76). Dass wir beim Schleimaal (Vertreter der Cyclostomata) 2 *Runt*-Gene und beim Katzenhai (Vertreter der Gnathostomata) 3 *Runt*-Gene fanden, passt zur Hypothese, dass es nur eine Genomduplikation in der frühen Evolution der Vertebraten gab, und es im Anschluss zu weiteren Duplikationen einzelner Genomabschnitte kam (75). Hierbei wurde nicht nur das *Runt*-Gen, sondern der gesamte *Runt*-Lokus in der Evolution der Vertebraten verdreifacht (65). Dies konnte über eine Analyse der Genabfolge (Syntenie) wahrscheinlich gemacht werden. Wir fanden eine gemeinsame Syntenie ausgehend vom Genom eines

Tunicaten (Manteltier, *Ciona intestinalis*) als Vertreter der Chordata mit ursprünglichen Merkmalen, bei dessen *Runt*-Gen in räumlicher Nähe ein *Clic*-Gen vorhanden war (65). Ebenfalls im Genom vom Menschen und Hühnchen besitzen *RUNX1-3* je ein benachbartes *CLIC*-Gen (65). Inzwischen wurde die Triplikation des gesamten *Runt*-Lokus in der frühen Evolution der Vertebraten weiter untermauert, da auch bei den drei *Runt*-Genen (*CmRunx1-3*) eines Vertreters der Chondrichthyes (*Callorhinchus milii*) benachbarte *Clic*-Gene zu finden sind (73).

In Bezug auf die *Runt*-Genexpression in der Stammart der Chordata ist es wahrscheinlich, dass der Darm eine ursprüngliche *Runt*-Expressionsdomäne war (63, 64). Betrachtet man Vertreter der Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Ringelwürmer (*Capitella teleta*) und Seeigel (*Strongylocentrotus purpuratus*) als phylogenetische Außengruppe der Chordata, so wird dort das *Runt*-Gen im Darm exprimiert (63, 70, 71). Passend dazu konnten wir eine hohe *Runt*-Genexpression im Kiemendarm vom Lanzettfischchen (*Branchiostoma lanceolatum*), Schleimaal (*Myxine glutinosa*) und Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*) nachweisen (64).

Die *Runt*-Genexpression im Kiemendarm ist relevant für ein Ziel dieser Habilitation: die Evolution und Funktion der *Runt*-Gene bei der Skelettbildung und T-Zellentwicklung besser zu verstehen. Denn in diesem Bereich des Kiemendarms haben sich in der Evolution der Vertebraten lymphoide Strukturen wie der Thymus für die T-Zellreifung entwickelt (77). Weiterhin besitzt der Kiemendarm Stützelemente und ist daher auch für die Skelettentwicklung relevant (64).

### **3.2 Evolution eines zentralen Gennetzwerks für die Skelettbildung bei den Chordata und eine essentielle Rolle von *RUNX2* in der Knochenbildung**

Die Evolution wird absteigend rekonstruiert (2, 5). D.h., wenn zwei oder mehrere Taxa gemeinsame Merkmale aufweisen (Synapomorphien), wird postuliert, dass die gemeinsame Stammart dieser Taxa dieses Merkmal als evolutionären Neuerwerb (Apomorphie) besaß (2, 5). In Bezug auf die Skelettbildung stellt sich die Frage, ob Masterregulatoren der Knorpel- und Knochenbildung bei Vertebraten auch bereits beim Lanzettfischchen und somit in der Stammart der Chordata vorhanden waren.

Der Kiemendarm des adulten Lanzettfischchens (*Branchiostoma lanceolatum*) wird durch 15 nm dicke Filamente gestützt, welche parallel zur Achse der Kiemenstangen verlaufen und durch einen Antikörper gegen Typ II Kollagen angefärbt werden (78, 79). Benachbart zu diesen

Stützfilamenten liegt ein einschichtiges endodermales Epithel, welches *Hedgehog* und das *Runt*-Gen stark exprimiert (64, 78). *Indian Hedgehog (IHH)* ist ein Masterregulator der Skelettentwicklung bei Vertebraten und wird direkt durch RUNX2 reguliert (80). Wir konnten zeigen, dass auch die Aktivität des *Hedgehog*-Gens im Lanzettfischchen direkt durch das Runt-Protein des Lanzettfischchens sowie das murine Runx2 reguliert werden kann (64). Weiterhin fanden wir im Kiemendarm eine starke Expression von *SoxE*. Dieses ist homolog zu *SOX8*, *SOX9* und *SOX10* der Vertebraten, wobei *SOX9* essentiell für die Knorpelbildung ist (81, 82). Durch eine japanische Arbeitsgruppe wurde bestätigt, dass fibrilläres Kollagen, *SoxE* und das *Runt*-Gen auch bei der Regeneration des zellulären Skeletts der oralen Zirren beim Lanzettfischchen (*Branchiostoma belcheri*) exprimiert wird (83).

Zusammengefasst spricht dies dafür, dass ein molekulares Netzwerk für die Skelettbildung mit fibrillärem Kollagen, *Runt*-, *SoxE*-, und *Hedgehog*-Genen bereits bei der Stammart der Chordata angelegt war und sich dieses nach *Runt*-, *Sox*-, und *Hedgehog*-Genduplikationen in der Evolution der Vertebraten weiter diversifizierte (64, 81, 84).

Für homologe Strukturen, welche morphologisch sehr variabel sein können, doch auf ein gemeinsames molekulares Netzwerk zurückzuführen sind, wurde der Begriff „deep homology“ geprägt (85). Dieses Konzept geht davon aus, dass in der Evolution anatomisch neue Strukturen daraus entstehen, dass bereits bestehende molekulare Netzwerke modifiziert werden und auch von anderen Zelltypen übernommen werden können (85). Dieses Denkmodell passt zum Befund, dass das *SoxE*-, *Hedgehog*- und *Runt*-Gen umfassende molekulare Netzwerk in endodermalen Kiemendarm-Zellen des Lanzettfischchens exprimiert ist und auch beim Zebrafisch (*Danio rerio*) eine endodermale Expression von *Runx3* für die Entwicklung des Knorpels im Kiemendarm benötigt wird (64, 86). Doch i.d.R. entstehen bei Vertebraten Knorpel und Knochen nicht aus endodermalen sondern aus mesenchymalen Stammzellen (14). Weiterhin wurde postuliert, dass das von Neuralleistenzellen ausgehende kraniale Skelett der Vertebraten entstanden ist, nachdem Neuralleistenzellen das ursprüngliche Gennetzwerk unter Beteiligung von *Sox9* für die Knorpelbildung von anderen Zelltypen übernommen hatten (87).

Neben einer Integration des genregulatorischen Netzwerks für Skelettbildung in neue Zelltypen wurde das molekulare Netzwerk auch erweitert. So wurde der **Vitamin D3 Rezeptor (VDR)** in der Evolution der Vertebraten in das *Runt*-Gennetzwerk integriert (88). Vitamin D3

ist für die Absorption von Calcium und Phosphat aus dem Darm von Bedeutung und die direkte Interaktion von Runx2 und VDR spielt bei der Entwicklung von Osteoblasten eine wesentliche Rolle (88, 89).

Unter dem Blickwinkel des „deep homology“ Konzepts wird verständlich, dass aus einem gemeinsamen, molekularen Entwicklungsmodul hervorgehende Strukturen durchaus morphologisch variabel sein können und an unterschiedlichen Lokalisationen vorkommen können (85). Die neu klonierten *Runt*-Gene aus Schleimaal und Katzenhai zeigten nicht nur eine Expression im Knorpel, sondern auch in den Zahnanlagen und zahnähnlichen Hautschuppen (Placoidschuppen) des Katzenhais (64). Die Expression der 3 *Runt*-Gene in den Placoidschuppen des Katzenhais hatte eine große Ähnlichkeiten zu dem Muster der *Runt*-Genexpression bei der Zahnentwicklung, was die klassische Ansicht unterstützt, dass Zähne und Placoidschuppen aus einem gemeinsamen Entwicklungsmodul hervorgegangen sind (18, 64, 90). Die Expression von *Runx2* befand sich dabei in der Region der Basalplatte (64). Dies spricht dafür, dass *Runx2* auch bei der Bildung der Hautknochenpanzer mit zahnähnlichen Strukturen der Osteostraci (Kieferlose Schwestergruppe der Gnathostomata) beteiligt war und macht es sehr wahrscheinlich, dass Knochen evolutionär zuerst in der Haut entstanden (19, 20).

In Bezug auf die Skelettbildung wurde in dieser Habilitation das Gennetzwerk von *RUNX2* genauer erforscht, mit dem Ziel, neue Gene mit Relevanz für die Knochenbildung zu entdecken (65). Hierzu wurden bei einem *Runx2*-Knockout Mausmodell in embryonalen Wildtyp versus *Runx2*<sup>-/-</sup> Oberarmknochen (Entwicklungstag E14.5) die Genexpressionsprofile miteinander verglichen. Es wurden 71 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert. 41 der 71 differentiell exprimierten Gene hatten eine bereits bekannte Funktion im Knochen und Knorpel wie z.B. *VDR* und *Ihh* (80, 88). Dies validierte die Brauchbarkeit des Screening-Ansatzes. Für 30 der identifizierten Gene war keine Rolle in der Skelettentwicklung bekannt (65). Für ein Gen mit damals unbekannter Funktion, *TMEM119* (*Transmembrane Protein 119*) konnte inzwischen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten beschrieben werden (91, 92).

Bei der Skelettentwicklung sind nicht nur Osteoblasten und Chondrozyten, sondern auch Osteoklasten von Bedeutung (93). Die Hauptaufgabe der Osteoklasten ist die Resorption von Knochengewebe (94). Im Gegensatz zu Chondrozyten und Osteoblasten, welche i.d.R. aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen, entwickeln sich die Osteoklasten aus

hämatopoetischen Vorläuferzellen (95). Bei der differentiellen Genexpressionsanalyse des *Runx2*-Knockout Mausmodells wurden auch spezifische Gene für Osteoklasten entdeckt, wie z.B. *Matrix Metalloproteinase 9* und *Kathepsin K* (65, 96, 97). Dies war zu erwarten, da im untersuchten Entwicklungsstadium (E14.5) bereits Blutgefäße in die Wildtyp-Oberarmknochen einwandern, während die Oberarmknochen von *Runx1*<sup>-/-</sup> Mäusen nur aus Knorpel bestehen (65).

### **3.3 Die Evolution der *Runt*-Transkriptionsfaktoren und ihre Rolle in der T-Zellentwicklung**

Während *RUNX2* für die Knochenbildung essentiell ist, hat *RUNX1* für die Blutbildung eine essentielle Funktion (44, 55, 56, 98). Da *Runt*-homologe Gene zusammen mit GATA-Transkriptionsfaktoren sowohl bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) als auch bei den Vertebraten bei der Blutbildung beteiligt sind, ist wahrscheinlich, dass sie dies auch in der Stammart der Chordata waren (44, 72, 99-101).

Mit einer Funktion von *Runt*-Genen in der Entwicklung des Immunsystems der Chordata ist die *Runt*-Genexpression im Kiemendarm vom Lanzettfischchen gut zu vereinbaren (64). Denn in der Stammesgeschichte der Vertebraten entstanden im Bereich des Kiemendarms lymphatische Organe wie die Tonsillen und der Thymus (2, 77). Da sich der Thymus auch in der Ontogenese der Säugetiere aus der Kiemendarmanlage entwickelt, wird hier die Stammesgeschichte teilweise rekapituliert (2). Eine Rolle von *Runt*-Genen bei der B- und T-Zell- sowie Thymusentwicklung konnte in dieser Habilitation bestätigt werden. Denn durch einen *Runx1*-Knockout wurde im Mausmodell die B- und T-Zellentwicklung stark beeinträchtigt und die Thymusstruktur (Cortex und Medulla) völlig aufgelöst (67).

TCR-Genumlagerungen finden im Thymus statt, wobei RAG-Komplexe beim Umlagerungsprozess an RSS-Sequenzmotive binden, welche sich an den Enden der V(D)J-Gensegmente befinden (35, 36, 102). Nach einer Trennung der DNA-Abschnitte durch die RAG-Komplexe werden die Gensegmente unter Einfügen von kurzen zufälligen N-Nukleotiden durch den „non homologous endjoining“ Signalweg verknüpft und es entsteht eine große Vielfalt von hochspezifischen TCRs (34, 102). Neuere Arbeiten zeigen, dass im Kiemendarm des Lanzettfischchens auch ein Vorläufer der *RAG*-Gene zu finden ist und evolutionär die *RAG1/2*-Gene der Vertebraten von einem Transposon (*ProtoRAG*) abstammen (103). Dieses

wurde in der Evolution der Vertebraten „domestiziert“ und ermöglichte die Umlagerungen der V(D)J-Gensegmente (103).

Beim Ziel dieser Habilitation, die Rolle von *RUNX1* in der T-Zellentwicklung besser zu verstehen, lag der Fokus auf der Untersuchung von TCR $\beta$ -Genumlagerungen. Um diese zuverlässig analysieren zu können, wurde eine neue Methode für die Hochdurchsatzsequenzierung von TCR-Genumlagerungen entwickelt (66). Hierzu wurde eine zweistufige PCR verwendet, bei der in der ersten Multiplex-PCR die individuellen TCR $\beta$  Genumlagerungen amplifiziert wurden und in einer zweiten PCR die Adaptoren für die Hochdurchsatzsequenzierung angefügt wurden (66). Da es bei zweistufigen PCRs ein großes Risiko von Kreuzkontamination durch Verschleppung von Amplikons von der ersten zur zweiten Amplifikationsrunde gibt, wurde durch kurze Sequenzelemente in den Primern ein Kontaminationsschutz eingebaut (66). Durch diesen konnten Kreuzkontaminationen effizient verhindert sowie potenzielle Restkontaminationen detektiert werden (66).

Mit dieser Methodik wurde die Rolle von *Runx1* in der T-Zellentwicklung in einem *Runx1*-Knockout Modell untersucht. In diesem Mausmodell war das Exon 5 des *Runx1* Gens deletiert, welches essentiell für die DNA-bindende *Runt*-Domäne ist (46, 67).

Bei einem homozygoten *Runx1*-Knockout zeigte die TCR $\beta$ -Analyse nicht nur eine starke Reduktion von TCR $\beta$ -Genumlagerungen, sondern auch eine höhere Anzahl von fehlerhaften (nichtfunktionalen) TCR $\beta$ -Genumlagerungen im Thymus (67). Weiterhin erhöhte sich durch einem *Runx1*-Knockout die Variabilität der CDR3-Länge sowohl in funktionalen als auch in nichtfunktionalen TCR $\beta$ -Genumlagerungen (67). Da im Thymus für nichtfunktionale TCR $\beta$ -Genumlagerungen keine TCR $\beta$ -MHC-Interaktion stattfinden kann, sind die Effekte von *Runx1* auf die CDR3-Architektur unabhängig von der T-Zellselektion im Thymus (102).

Zusätzlich konnten wir durch CHIP-Analysen nachweisen, dass *Runx1* an die murinen Initiationsstellen der TCR $\beta$ -Genumlagerungen den D1- und D2-Segmente bindet, welche innerhalb der Mammalia evolutionär konservierte *RUNX1*-Heptamer-Motive aufweisen (67). Im Gegensatz dazu findet sich im Genom vom Zebrafisch (*Danio rerio*) nur ein TCR $\beta$  D1-Segment mit Heptameren ohne eine überlappende Bindungsstellen für *Runx1* und passend dazu zeigte ein *Runx1*-Knockout im Zebrafisch keinen Einfluss auf T-Zellzahlen und TCR $\beta$ -Genumlagerungen (45). Demnach hat sich eine Rolle von *RUNX1* als Rekombinase-Kofaktor

bei der TCR $\beta$ -Genumlagerung erst später in der Evolution, in der Stammart der Tetrapoda oder der Mammalia entwickelt.

Das Konzept, dass RUNX1 neben der Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine zweite Rolle als Rekombinase-Kofaktor hat, ist neu, denn bisher wurde diese neue Rolle von RUNX1 nur am Beispiel von TCR $\delta$ -Genumlagerungen beschrieben (54). RUNX1 bindet an das humane TCR $\delta$  D2 RUNX1-Heptamer-Motiv, verstärkt die Bindung von RAG1 an dieses Motiv und beeinflusst so die TCR $\delta$ -Genumlagerungen (54).

Im Gegensatz zum homozygoten *Runx1*-Knockout im Mausmodell konnte bei einer heterozygoten *Runx1*-Deaktivierung kaum ein Einfluss auf die TCR $\beta$ -Genumlagerungen festgestellt werden (67). Dies spricht dafür, dass eine heterozygote *RUNX1*-Expression ausreichend ist, um die RUNX1-Funktion als Rekombinase-Kofaktor bei der TCR $\beta$ -Genumlagerung zu erfüllen.

### **3.4 Hinweise für eine Rolle von RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor bei der Entstehung von pathologischen Deletionen**

Der Befund, dass sich ein heterozygoter *Runx1*-Knockout kaum auf das TCR $\beta$ -Repertoire auswirkte und eine homozygote Deaktivierung von *Runx1* einen starken Einfluss auf die TCR $\beta$ -Genumlagerungen (physiologische Deletionen) hatte, führte zur Frage, ob RUNX1 als Kofaktor der RAG-Komplexe auch bei pathologischen Deletionen beteiligt sein könnte (67).

RAG1/2-Komplex getriebene Rekombinationen und Deletionen sind ein wesentlicher Faktor bei der Pathogenese von Leukämien (*ETV6-RUNX1* ALL und der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) (104, 105). Als Evidenz hierfür wurde neben einer starken Expression von RAG1 und RAG2 die Anreicherung von kompletten RSS oder einzelnen Heptamer-Motiven an rekurrenten Deletionsrändern gewertet (104, 105).

Als Hinweis, dass RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor wahrscheinlich an diesem pathologischen Deletionsmechanismus beteiligt ist, konnten wir nachweisen, dass RUNX1-Bindungsmotive überlappend mit den Heptameren der RSS an rekurrenten Deletionsrändern bei der *ETV6-RUNX1* ALL signifikant angereichert sind (67). Weiterhin konnten wir zeigen, dass bei einem häufig in der *ETV6-RUNX1* ALL und der CML vorkommenden Bruchpunkt im *CDKN2A/B*-Lokus das RUNX1-Bindungsmotiv funktionell relevant ist (67, 104, 105).



Auch wenn eine signifikante Anreicherung von RUNX1-Heptamer-Motiven an den Deletionsrändern ein Argument dafür ist, dass RUNX1 beim pathologischen Deletionsmechanismus in der *ETV6-RUNX1* ALL beteiligt ist, zeigten unsere Daten jedoch auch, dass RUNX1 nicht essentiell dafür ist. Denn es gab auch Deletionsränder ohne RUNX1-Heptamer-Motive (67). Dass RUNX1 nicht essentiell für den RAG1/2-Komplex getriebenen Deletionsprozess ist, passt zu den *Runx1*-Knockout Daten, bei dem physiologische Deletionen während der TCR $\beta$ -Genumlagerung noch stattfinden, wenn auch in deutlich reduziertem Umfang (67).

Ein mögliches Modell für RUNX1 als Rekombinase-Kofaktor bei pathologischen Deletionen ist, dass RUNX1 die Bindung und Funktionalität von RAG1 positiv beeinflusst. Zu diesem Modell passt, dass eine direkte Bindung von RUNX1 an RAG1 in CD34-positive Thymozyten und der ALL Zelllinie Molt-4 gezeigt wurde (54). Das genaue Wirkprinzip eines pathologischen Deletionsmechanismus unter Beteiligung von RUNX1 und in welchen Leukämie-Entitäten dieser aktiv ist, muss jedoch in weiteren Studien umfassender untersucht werden. Eine interessante Frage ist auch, ob das RUNX1-ETV6 Protein am pathologischen Deletionsprozess beteiligt ist, denn es wurde gezeigt, dass dieses an RUNX1-Motive binden kann (52, 53).

Unter einem evolutionsbiologischen Blickwinkel wird deutlich, dass die in der Evolution der Vertebraten neu entstandene Maschinerie der V(D)J-Rekombination große Vorteile für die Mehrzahl der Individuen brachte. Jedoch bringt eine fehlgeleitete Rekombinationsmaschinerie Risiken mit sich, z.B. bei der Entstehung von pathologischen Deletionen bei der *ETV6-RUNX1* ALL. Eine duale Rolle von RUNX1 als Transkriptionsfaktor und Rekombinase-Kofaktor könnte erklären, dass RUNX1 eines der meist mutierten bzw. translozierten Gene bei malignen hämatologischen Erkrankungen ist (48, 49, 105).

## 4 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Evolution der *Runt*-Gene in der Stammesgeschichte der Chordata zu rekonstruieren, sowie die *Runt*-Genfunktion bei der Skelettbildung und T-Zellentwicklung besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der Stammart der Chordata nur ein *Runt*-Gen vorhanden war und der *Runt*-Lokus in der Evolution der Vertebraten tripliziert wurde. Beim Lanzettfischchen als Vertreter der Chordata mit ursprünglichen Merkmalen war ein molekulares Netzwerk für Skelettbildung, unter Beteiligung von *SoxE*, *Hedgehog*- und *Runt*-Genen, im Kiemendarm exprimiert. Dieses molekulare Netzwerk wurde in der Evolution der Vertebraten nach Genduplikationen diversifiziert und diente als molekulares Entwicklungsmodul für Knorpel, Knochen, Placoidschuppen und Zähne. In diesem Netzwerk ist *Runx2* essentiell für die Knochenbildung und im Rahmen dieser Habilitation konnten durch ein Expressionsscreening in einem *Runx2*-Knockout Mausmodell bereits bekannte und neue Transkripte mit Relevanz für die Knochenbildung entdeckt werden. Für eines dieser Gene mit damals unbekannter Funktion, *TMEM119* (*Transmembrane Protein 119*) wurde inzwischen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten beschrieben.

Des Weiteren wurde die Bedeutung von *Runx1* in der T-Zellentwicklung anhand eines *Runx1*-Knockout Mausmodells erforscht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Hochdurchsatzsequenzierung von TCR $\beta$ -Genumlagerungen. Zur zuverlässigen Herstellung der Amplikon-Libraries wurde eine zweistufige PCR-Methodik entwickelt, welche durch einen eingebauten Kontaminationsschutz Kreuzkontaminationen von der ersten zur zweiten PCR-Stufe verhindert. Unsere Analysen zeigten, dass aufgrund des *Runx1*-Knockouts TCR $\beta$ -Genumlagerung nur in sehr reduziertem Umfang stattfanden und wir konnten Veränderungen der V(D)J-Struktur nachweisen. Die T-Zellentwicklung war stark reduziert und die Thymusstruktur (Cortex und Medulla) ging verloren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass *Runx1* an *Runx1*-Bindungsstellen an der Initiationsstelle der TCR $\beta$ -Genumlagerungen bindet.

Zusammen mit publizierten Daten, die eine direkte Bindung von *Runx1* an das Rekombinations-aktivierende Protein 1 in sich entwickelnden T-Zellen zeigten, spricht dies

dafür, dass Runx1 neben der Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine Rolle als Rekombinase-Kofaktor hat.

Unsere Analysen sprechen weiterhin dafür, dass RUNX1 nicht nur bei TCR $\beta$ -Genumlagerungen (physiologischen Deletionen), sondern auch bei pathologischen Deletionen als Rekombinase-Kofaktor beteiligt ist. Denn RUNX1-Bindungsstellen sind an rekurrenten Deletionsrändern bei der ALL mit einer *ETV6-RUNX1* Translokation signifikant angereichert und wir konnten zeigen, dass eine RUNX1-Bindungsstelle im *CDKN2A/B* Bruchpunkt funktionell relevant ist.

Dies zeigt, dass Mechanismen wie TCR-Genumlagerungen, welche in der Evolution der Vertebraten zu einem sehr effektiven Immunsystem führten, bei einer fehlgeleiteten Rekombinationsmaschinerie Risiken mit sich bringen, z.B. bei der Entstehung von pathologischen Deletionen bei der *ETV6-RUNX1* ALL.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life. 5th thousand. ed. London,: J. Murray; 1860. ix, 1 , 502 p. p.
2. Sudhaus W, Rehfeld K. Einführung in die Phylogenetik und Systematik. 1 ed: Stuttgart: Gustav Fischer; 1992. 241 p. p.
3. Huxley TH. Lectures on the elements of comparative anatomy. London,: J. Churchill and Sons; 1864. xi, 303 p. p.
4. Hall BK. Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology. Australia ; San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press; 2005. xxviii, 760 p. p.
- 5 Hennig W. Phylogenetic systematics. Urbana,: University of Illinois Press; 1966. 263 p. p.
6. Stemple DL. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*. 2005;132(11):2503-12.
7. Ax P. Das Phylogenetische System. Systematisierung der lebenden Natur aufgrund ihrer Phylogenese. 1 ed: Stuttgart, New York: Gustav Fischer; 1984. 349 p. p.
8. Trinajstic K, Marshall C, Long J, Bifield K. Exceptional preservation of nerve and muscle tissues in Late Devonian placoderm fish and their evolutionary implications. *Biol Lett*. 2007;3(2):197-200.
9. Sumida SS, Martin KLM. Amniote origins: completing the transition to land. San Diego: Academic Press; 1997. x, 510 p. p.
10. Jefferies RPS. The ancestry of the vertebrates. Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge University Press; 1986. viii, 376 p. p.
11. Ota KG, Fujimoto S, Oisi Y, Kuratani S. Identification of vertebra-like elements and their possible differentiation from sclerotomes in the hagfish. *Nat Commun*. 2011;2:373.
12. Kuraku S, Hoshiyama D, Katoh K, Suga H, Miyata T. Monophyly of lampreys and hagfishes supported by nuclear DNA-coded genes. *J Mol Evol*. 1999;49(6):729-35.
13. Takezaki N, Figueroa F, Zaleska-Rutczynska Z, Klein J. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol Biol Evol*. 2003;20(2):287-92.
14. Zhang G, Eames BF, Cohn MJ. Chapter 2. Evolution of vertebrate cartilage development. *Curr Top Dev Biol*. 2009;86:15-42.
15. Zhang G, Cohn MJ. Hagfish and lancelet fibrillar collagens reveal that type II collagen-based cartilage evolved in stem vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(45):16829-33.
16. Zhang G, Miyamoto MM, Cohn MJ. Lamprey type II collagen and Sox9 reveal an ancient origin of the vertebrate collagenous skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3180-5.
17. Reif WE. Development of dentition and dermal skeleton in embryonic Scyliorhinus canicula. *J Morphol*. 1980;166(3):275-88.
18. Donoghue PC, Sansom IJ, Downs JP. Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2006;306(3):278-94.
19. Janvier P. Early vertebrates. Oxford: Clarendon Press; 1996.
20. O'Shea J, Keating JN, Donoghue PCJ. The dermal skeleton of the jawless vertebrate *Tremataspis mammillata* (Osteostraci, stem-Gnathostomata). *J Morphol*. 2019;280(7):999-1025.

21. Downs JP, Donoghue PC. Skeletal histology of *Bothriolepis canadensis* (Placodermi, Antiarchi) and evolution of the skeleton at the origin of jawed vertebrates. *J Morphol.* 2009;270(11):1364-80.
22. Giles S, Rucklin M, Donoghue PC. Histology of "placoderm" dermal skeletons: Implications for the nature of the ancestral gnathostome. *J Morphol.* 2013;274(6):627-44.
23. Donoghue PC, Sansom IJ. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microsc Res Tech.* 2002;59(5):352-72.
24. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008334.
25. Zapata AG, Torroba M, Vicente A, Varas A, Sacedon R, Jimenez E. The relevance of cell microenvironments for the appearance of lympho-haemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histol Histopathol.* 1995;10(3):761-78.
26. Curtis SK, Cowden RR, Nagel JW. Ultrastructure of the bone marrow of the salamander *Plethodon glutinosus* (Caudata: Plethodontidae). *J Morphol.* 1979;159(2):151-83.
27. Kapp FG, Perlin JR, Hagedorn EJ, Gansner JM, Schwarz DE, O'Connell LA, et al. Protection from UV light is an evolutionarily conserved feature of the haematopoietic niche. *Nature.* 2018;558(7710):445-8.
28. Kamm K, Schierwater B, DeSalle R. Innate immunity in the simplest animals - placozoans. *BMC Genomics.* 2019;20(1):5.
29. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002;296(5566):298-300.
30. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):47-59.
31. Boehm T, Hirano M, Holland SJ, Das S, Schorpp M, Cooper MD. Evolution of Alternative Adaptive Immune Systems in Vertebrates. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:19-42.
32. Janeway C. *Immunobiology : the immune system in health and disease.* 6th ed. New York: Garland Science; 2005. xxiii, 823 p. p.
33. Borst J, Jacobs H, Brouns G. Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(2):181-90.
34. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell.* 2004;116(2):299-311.
35. Eastman QM, Leu TM, Schatz DG. Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature.* 1996;380(6569):85-8.
36. Bassing CH, Alt FW, Hughes MM, D'Auteuil M, Wehrly TD, Woodman BB, et al. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature.* 2000;405(6786):583-6.
37. Roth DB. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6).
38. Swerdlow SH. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
39. Bogovski S, Rossi L, Bocchini V, Lastraioli S, Aiello C, Santi L. Immunohistochemical characterization of malignant lymphoma in northern pike. *J Fish Dis.* 1994;17:557-66.
40. Harshbarger J, Ostrander G, Hopkins J. Cancer in sharks, skates, rays and other lower fishes. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2000;41.
41. Seitz V, Hummel M, Walter J, Stein H. Evolution of classic Hodgkin lymphoma in correlation to changes in the lymphoid organ structure of vertebrates. *Dev Comp Immunol.* 2003;27(1):43-53.

42. Rennert J, Coffman JA, Mushegian AR, Robertson AJ. The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol Biol.* 2003;3:4.
43. Gergen JP, Wieschaus EF. The localized requirements for a gene affecting segmentation in *Drosophila*: analysis of larvae mosaic for runt. *Dev Biol.* 1985;109(2):321-35.
44. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.* 1996;84(2):321-30.
45. Chi Y, Huang Z, Chen Q, Xiong X, Chen K, Xu J, et al. Loss of runx1 function results in B cell immunodeficiency but not T cell in adult zebrafish. *Open Biol.* 2018;8(7).
46. Niebuhr B, Kriebitzsch N, Fischer M, Behrens K, Gunther T, Alawi M, et al. Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development. *Blood.* 2013;122(3):413-23.
47. Wong WF, Nakazato M, Watanabe T, Kohu K, Ogata T, Yoshida N, et al. Over-expression of Runx1 transcription factor impairs the development of thymocytes from the double-negative to double-positive stages. *Immunology.* 2010;130(2):243-53.
48. Harada Y, Harada H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol.* 2009;220(1):16-20.
49. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 2017;129(15):2070-82.
50. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet.* 2013;381(9881):1943-55.
51. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML-1 fusion gene. its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;122(2):73-8.
52. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995;86(11):4263-9.
53. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol.* 1996;16(4):1349-55.
54. Cieslak A, Le Noir S, Trinquand A, Lhermitte L, Franchini DM, Villarese P, et al. RUNX1-dependent RAG1 deposition instigates human TCR-delta locus rearrangement. *J Exp Med.* 2014;211(9):1821-32.
55. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997;89(5):765-71.
56. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997;89(5):773-9.
57. Lotem J, Levanon D, Negreanu V, Leshkowitz D, Friedlander G, Groner Y. Runx3-mediated transcriptional program in cytotoxic lymphocytes. *PLoS one.* 2013;8(11):e80467.
58. Li L, Patsoukis N, Petkova V, Boussiotis VA. Runx1 and Runx3 are involved in the generation and function of highly suppressive IL-17-producing T regulatory cells. *PLoS one.* 2012;7(9):e45115.

59. Balogh P, Adelman ER, Pluvinage JV, Capaldo BJ, Freeman KC, Singh S, et al. RUNX3 levels in human hematopoietic progenitors are regulated by aging and dictate erythroid-myeloid balance. *Haematologica*. 2020;105(4):905-13.
60. Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 2002;109(1):113-24.
61. Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, et al. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *EMBO J*. 2002;21(13):3454-63.
62. Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol*. 2002;245(1):95-108.
63. Stricker S, Poustka AJ, Wiecha U, Stiege A, Hecht J, Panopoulou G, et al. A single amphioxus and sea urchin runt-gene suggests that runt-gene duplications occurred in early chordate evolution. *Dev Comp Immunol*. 2003;27(8):673-84.
64. Hecht J, Stricker S, Wiecha U, Stiege A, Panopoulou G, Podsiadlowski L, et al. Evolution of a core gene network for skeletogenesis in chordates. *PLoS Genet*. 2008;4(3):e1000025.
65. Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, et al. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns*. 2007;7(1-2):102-12.
66. Seitz V, Schaper S, Droge A, Lenze D, Hummel M, Hennig S. A new method to prevent carry-over contaminations in two-step PCR NGS library preparations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(20):e135.
67. Seitz V, Kleo K, Droge A, Schaper S, Elezkurtaj S, Bedjaoui N, et al. Evidence for a role of RUNX1 as recombinase cofactor for TCRbeta rearrangements and pathological deletions in ETV6-RUNX1 ALL. *Sci Rep*. 2020;10(1):10024.
68. Mayr E. Systematics and the origin of species. New York ; Guildford: Columbia University Press; 1982.
69. Sullivan JC, Sher D, Eisenstein M, Shigesada K, Reitzel AM, Marlow H, et al. The evolutionary origin of the Runx/CBFbeta transcription factors--studies of the most basal metazoans. *BMC Evol Biol*. 2008;8:228.
70. Seaver EC, Yamaguchi E, Richards GS, Meyer NP. Expression of the pair-rule gene homologs runt, Pax3/7, even-skipped-1 and even-skipped-2 during larval and juvenile development of the polychaete annelid *Capitella teleta* does not support a role in segmentation. *Evodevo*. 2012;3:8.
71. Nam S, Jin YH, Li QL, Lee KY, Jeong GB, Ito Y, et al. Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*. 2002;22(2):547-54.
72. Milchanowski AB, Henkenius AL, Narayanan M, Hartenstein V, Banerjee U. Identification and characterization of genes involved in embryonic crystal cell formation during *Drosophila* hematopoiesis. *Genetics*. 2004;168(1):325-39.
73. Nah GS, Lim ZW, Tay BH, Osato M, Venkatesh B. Runx family genes in a cartilaginous fish, the elephant shark (*Callorhynchus milii*). *PloS one*. 2014;9(4):e93816.
74. Ohno S. Evolution by gene duplication. London: Allen & Unwin; 1970.
75. Smith JJ, Keinath MC. The sea lamprey meiotic map improves resolution of ancient vertebrate genome duplications. *Genome Res*. 2015;25(8):1081-90.
76. Sacerdot C, Louis A, Bon C, Berthelot C, Roest Crolius H. Chromosome evolution at the origin of the ancestral vertebrate genome. *Genome Biol*. 2018;19(1):166.

77. Matsunaga T, Rahman A. In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. *Scand J Immunol.* 2001;53(1):1-6.
78. Rähr H. Ultrastructure of gill bars of *Branchiostoma lanceolatum* with special reference to gill skeleton and blood vessels (Cephalochordata). *Zoomorphology.* 1982;99:167–80.
79. Rychel AL, Smith SE, Shimamoto HT, Swalla BJ. Evolution and development of the chordates: collagen and pharyngeal cartilage. *Mol Biol Evol.* 2006;23(3):541-9.
80. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, et al. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 2004;18(8):952-63.
81. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 2000;227(2):239-55.
82. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999;22(1):85-9.
83. Kaneto S, Wada H. Regeneration of amphioxus oral cirri and its skeletal rods: implications for the origin of the vertebrate skeleton. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2011;316(6):409-17.
84. Irimia M, Royo JL, Burguera D, Maeso I, Gomez-Skarmeta JL, Garcia-Fernandez J. Comparative genomics of the Hedgehog loci in chordates and the origins of Shh regulatory novelties. *Sci Rep.* 2012;2:433.
85. Shubin N, Tabin C, Carroll S. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature.* 2009;457(7231):818-23.
86. Flores MV, Lam EY, Crosier P, Crosier K. A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. *Dev Dyn.* 2006;235(11):3166-76.
87. Jandzik D, Garnett AT, Square TA, Cattell MV, Yu JK, Medeiros DM. Evolution of the new vertebrate head by co-option of an ancient chordate skeletal tissue. *Nature.* 2015;518(7540):534-7.
88. Marcellini S, Bruna C, Henriquez JP, Albistur M, Reyes AE, Barriga EH, et al. Evolution of the interaction between Runx2 and VDR, two transcription factors involved in osteoblastogenesis. *BMC Evol Biol.* 2010;10:78.
89. Meyer MB, Benkusky NA, Lee CH, Pike JW. Genomic determinants of gene regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 during osteoblast-lineage cell differentiation. *J Biol Chem.* 2014;289(28):19539-54.
90. Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech Dev.* 2002;119 Suppl 1:S107-10.
91. Kanamoto T, Mizuhashi K, Terada K, Minami T, Yoshikawa H, Furukawa T. Isolation and characterization of a novel plasma membrane protein, osteoblast induction factor (obif), associated with osteoblast differentiation. *BMC Dev Biol.* 2009;9:70.
92. Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Kitazawa R, Kitazawa S, et al. Parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation and interacts with the bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(11):9787-96.
93. Martin A, Xiong J, Koromila T, Ji JS, Chang S, Song YS, et al. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. *Bone.* 2015;75:96-104.



94. Soung do Y, Kalinowski J, Baniwal SK, Jacome-Galarza CE, Frenkel B, Lorenzo J, et al. Runx1-mediated regulation of osteoclast differentiation and function. *Mol Endocrinol.* 2014;28(4):546-53.
95. Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, et al. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood.* 2010;115(14):2769-76.
96. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2005;25(19):8581-91.
97. Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Luth A, et al. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest.* 2013;123(2):666-81.
98. Senserrich J, Batsivari A, Rybtsov S, Gordon-Keylock S, Souilhol C, Buchholz F, et al. Analysis of Runx1 Using Induced Gene Ablation Reveals Its Essential Role in Pre-liver HSC Development and Limitations of an In Vivo Approach. *Stem Cell Reports.* 2018;11(3):784-94.
99. Waltzer L, Ferjoux G, Bataille L, Haenlin M. Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* 2003;22(24):6516-25.
100. Tracey WD, Jr., Pepling ME, Horb ME, Thomsen GH, Gergen JP. A *Xenopus* homologue of aml-1 reveals unexpected patterning mechanisms leading to the formation of embryonic blood. *Development.* 1998;125(8):1371-80.
101. Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MV, Postlethwait JH, Vitas MR, Baas AM, et al. Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development.* 2002;129(8):2015-30.
102. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell.* 2002;109 Suppl:S45-55.
103. Huang S, Tao X, Yuan S, Zhang Y, Li P, Beilinson HA, et al. Discovery of an Active RAG Transposon Illuminates the Origins of V(D)J Recombination. *Cell.* 2016;166(1):102-14.
104. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2014;46(2):116-25.
105. Thomson DW, Shahrin NH, Wang PPS, Wadham C, Shanmuganathan N, Scott HS, et al. Aberrant RAG-mediated recombination contributes to multiple structural rearrangements in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020.

## 6 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinen wissenschaftlichen Lehrern und Mentoren für ihre umfassende Förderung. Dies sind in chronologischer Reihenfolge Walter Sudhaus, Michael Hummel und Stefan Mundlos. Ganz besonders bedanke ich mich bei Michael Hummel, der mich schon während meiner Promotion sehr gut betreute, mir ein nachhaltiges wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte und dessen konstruktive Kritik immer wieder sehr hilfreich war. Ohne ihn wäre eine Umsetzung meiner Arbeiten nicht möglich gewesen.

Für die kollegiale und sehr gute Zusammenarbeit danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Michael Hummel, namentlich Erika Berg, Lora Dimitrova, Burkhard Hirsch, Maria Joosten, Karsten Kleo, Hedwig Lammert, Dido Lenze, Elisabeth Oker, Anke Seegebarth, Anke Sommerfeld und der Arbeitsgruppe von Stefan Mundlos, namentlich Jochen Hecht, Asita Stiege, und Sigmar Stricker. Weiterhin danke ich für eine inspirierende und produktive Zusammenarbeit den Mitarbeitern der HS Diagnostics GmbH, namentlich Anja Dröge, Rudolf Hammer, Steffen Hennig und Sigrid Schaper.

David Horst danke ich, für die Ermutigung diese Habilitation abzuschließen.

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir außerhalb des wissenschaftlichen Arbeitens am Herzen liegen, Eltern, Familie und Freunde.

## 7 Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift