

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung und Charakterisierung von ERG-regulierten  
Signalwegen bei akuten Leukämien

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Bock

aus Perleberg

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. C. Baldus  
                          2. Prof. Dr. Mi. Hummel  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Ruthardt

Datum der Promotion: 03. Juni 2012

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die akute Leukämie.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie und Klassifizierung.....	1
1.1.2 Ätiologie und Leukämogenese.....	3
1.1.3 Klinisches Bild und Diagnostik.....	4
1.1.4 Therapie .....	5
1.1.5 Entwicklung neuer Therapieoptionen.....	6
<b>1.2 Molekulare Charakterisierung der ETS Transkriptionsfaktoren ....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Der ETS Transkriptionsfaktor ERG .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Struktur und Regulationsmechanismen.....	8
1.3.2 Physiologische Funktion .....	9
1.3.3 Onkogene Potenz und prognostische Bedeutung .....	10
<b>1.4 Targetidentifizierung: Chromatin-Immunopräzipitation on chip..</b>	<b>12</b>
<b>2. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Feststoffe .....	17
3.1.2 Flüssigkeiten.....	17
3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze .....	17
3.1.4 Kinaseinhibitoren .....	17
3.1.5 Puffer .....	18
3.1.6 Antikörper .....	20
3.1.7 Enzyme .....	20
3.1.8 Reagenzien für Polymerasekettenreaktion .....	20
3.1.9 Primer .....	20
3.1.10 Aufreinigungs- und Amplifizierungsreagenzien.....	23

3.1.11	<b>Geräte</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.2.1	<b>Allgemeine Methoden</b> .....	<b>23</b>
I.	Zellkultur .....	23
II.	Isolation leukämischer Blasten .....	24
III.	Extraktion von Ribonukleinsäure .....	24
IV.	Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure .....	25
V.	Herstellung von Proteinlysaten .....	26
VI.	Spektralphotometrische Quantifizierung der DNA und RNA.....	26
VII.	Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bio-Rad Protein Assay.....	26
VIII.	Synthese komplementärer DNA aus RNA.....	27
3.2.2	<b>Polymerasekettenreaktion</b> .....	<b>27</b>
I.	Design von Oligonukleotid-Primern .....	27
II.	Überprüfen der Primerspezifität mittels PCR.....	28
III.	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
IV.	Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem PCR Purification Kit.....	29
V.	Quantitative real-time PCR.....	30
3.2.3	<b>Chromatin-Immunopräzipitation on chip</b> .....	<b>31</b>
I.	Chromatin-Immunopräzipitation.....	31
II.	DNA Amplifikation mit dem Whole Genome Amplifikation Kit.....	33
III.	ChIP-chip Versuche an der Zelllinie Jurkat.....	34
IV.	ChIP-chip an primären Leukämieproben .....	35
V.	Bioinformatische Analyse der ChIP-chip Daten .....	38
3.2.4	<b>Zellkulturmethoden</b> .....	<b>38</b>
I.	Transfektion mit small-interfering RNA.....	38
II.	Transfektion von K562 Zellen mit einem induzierbaren Vektorkonstrukt (Tet-on System) .....	39
III.	Zellviabilitätsmessung .....	39
3.2.5	<b>Proteinanalyse</b> .....	<b>41</b>
I.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Auftrennen des Proteinlysats...	41
II.	Western Blot.....	41
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>

<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der ChIP-chip Versuche.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Anreicherung des ETS-Transkriptionsfaktorbindungsmotivs nach ChIP-chip .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>ERG-regulierte Funktionen und Signalwege.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Validierung von Targetgenen .....</b>	<b>55</b>
4.4.1	Validierung von Targetgenen in der Zelllinie Jurkat .....	55
4.4.2	Validierung von Targetgenen an primären Leukämieproben .....	56
<b>4.5</b>	<b>Expression von Targetgenen nach <i>ERG</i>-Modulation .....</b>	<b>59</b>
4.5.1	Modulation der <i>ERG</i> -Expression ( <i>siERG/ tet-on</i> ).....	59
4.5.2	Expression von Targetgenen nach <i>ERG knock down</i> .....	60
4.5.3	Validierung von Targetgenen an K562 Zellen nach <i>ERG</i> -Induktion.....	61
<b>4.6</b>	<b>Einfluss von <i>ERG</i> auf Proliferation und Resistenzverhalten .....</b>	<b>63</b>
4.6.1	Einfluss der <i>ERG</i> -Expression auf die Proliferation .....	63
4.6.2	Einfluss von <i>ERG</i> auf die Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren .....	63
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>ERG als Transkriptionsaktivator des nicht kanonischen WNT-Gens WNT11 .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>ERG-vermittelte Regulation von Kinasekaskaden und kanonischen Signalwegen.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3</b>	<b><i>ERG</i>-Expression bewirkt einen Proliferationsvorteil gegenüber Kinaseinhibitoren.....</b>	<b>73</b>
<b>5.4</b>	<b>Regulation von Funktionen der Stammzellnische durch ERG.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5</b>	<b>Starke Heterogenität der ChIP-chip Versuche .....</b>	<b>78</b>

<b>5.6 Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse .....</b>	<b>80</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>83</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>VI</b>
<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>VI</b>
<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>IX</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>X</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>XI</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die akute Leukämie

Das Krankheitsbild Leukämie wurde erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben. Leukämie (leuk-: weiß, ämie: Blut) bezeichnet eine klonale maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, die durch unkontrollierte Expansion der entarteten Zellen zu einer Verdrängung der regulären Blutbildung führt. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine stark erhöhte Anzahl unreifer Progenitoren (Blasten) im Knochenmark aus. Es kommt zu einer Inhibierung der normalen Hämatopoese durch leukämische Blasten mit daraus folgender Anämie, Abwehrschwäche (infolge der Leukozytopenie) und verstärkter Blutungsneigung (Zeichen der Thrombozytopenie) [1].

Die Einteilung der Leukämie erfolgt anhand der Dynamik des Krankheitsverlaufs in akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien sind unbehandelt innerhalb von wenigen Wochen tödlich. Der Betroffene verstirbt meist an den Folgen der Knochenmarkinsuffizienz. Die chronischen Leukämien verlaufen über Jahre protrahiert und die beteiligten Zellen weisen in der Regel einen höheren Differenzierungsgrad auf. Anhand der vorherrschenden Zelllinie werden die verschiedenen Leukämien in lymphatische und myeloische Leukämien eingeteilt. Demnach unterscheidet man eine akute lymphoblastische Leukämie (ALL), eine akute myeloische Leukämie (AML), eine chronische lymphatische Leukämie (CLL) und eine chronische myeloische Leukämie (CML).

Da sich diese Arbeit vorrangig mit den akuten Leukämien befasst, erfolgt nun eine genauere Beschreibung dieser Entitäten.

### 1.1.1 Epidemiologie und Klassifizierung

Die AML ist die häufigste akute Leukämie des Erwachsenenalters mit einer jährlichen Inzidenz zwischen 3 bis 8 pro 100.000 Einwohner [2-4]. Sie ist eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters und stellt eine seltene Diagnose vor dem 40. Lebensjahr dar. So steigt die Inzidenz von 1,8 pro 100.000 bei den unter 65-Jährigen auf 17 pro 100.000 bei den über 65-Jährigen [2, 4].

Die gebräuchlichste Klassifikation der AML ist die *French-American-British Working Group for Leukemia Classification* (FAB-Klassifikation), die anhand der Zytochemie und Morphologie der beteiligten Blasten erfolgt (Tabelle 1) [5]. Sie umfasst 7 Subtypen der

## Einleitung

AML, die jedoch keine Aussage bezüglich der Prognose des Patienten erlauben, sondern lediglich deskriptiven Charakter haben. Die FAB-Klassifikation wird daher zusehends durch die modernere WHO-Klassifikation abgelöst, die neben den zytomorphologischen auch noch zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika der leukämischen Blasten betrachtet [6].

**Tab. 1 FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie.**

M0	Minimal differenzierte Leukämie
M1	Myeloblastische Leukämie ohne Ausreifung
M2	Myeloblastische Leukämie mit Ausreifung
M3	Promyelozytenleukämie
M4	Myelomonozytäre Leukämie
(M4Eo	Variante mit Vermehrung abnormer eosinophiler Granulozyten im Knochenmark)
M5	Monozytäre Leukämie
M6	Erythroleukämie
M7	Megakaryoblastische Leukämie

Die ALL ist mit einer Inzidenz von 1,5 Erkrankungsfällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr eine seltene maligne Erkrankung [4]. Die Altersverteilung der ALL zeigt einen zweigipfligen Verlauf, mit einem ersten Maximum zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr und einer Inzidenz von 8/100.000 und einem zweiten Anstieg der Inzidenz nach dem 40. Lebensjahr. Sie ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter [7, 8].

Die Einteilung der ALL entsprechend der FAB-Gruppe erfolgt an Hand der Morphologie der Blasten in drei Subtypen: Der L<sub>1</sub>-Subtyp weist kleine gleichförmige Blasten mit geringem Zytoplasmaanteil auf. Der L<sub>2</sub>-Subtyp zeigt größere Blasten mit auffälligen Nukleoli und größerem Zytoplasmaanteil. Bei dem L<sub>3</sub>-Subtyp sind die Blasten sehr groß mit auffälligen Nukleoli und basophilem Zytoplasma sowie zytoplasmatischen Vakuolen. Diese Klassifikation erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf die Prognose des Patienten. An Hand immunologischer Marker kann die B-Linien ALL weiter unterteilt werden in die pro-B, die common, die prä-B und die reife B-ALL. Die T-Linien ALL kann in die pro-T, die prä-T, die thymische und die reife T-ALL eingeteilt werden.



### 1.1.2 Ätiologie und Leukämogenese

Die Ursachen für akute Leukämien sind in ihrer Komplexität noch nicht verstanden, allerdings konnten mehrere genetische, chromosomale und epigenetische Veränderungen identifiziert werden, die mit akuten Leukämien assoziiert sind.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten Leukämie sind z.B. ionisierende Strahlung [9, 10], alkylierende Substanzen bei vorangegangener antineoplastischer Therapie [11], Benzol [12], Zigarettenrauchen [13, 14] und genetische Erkrankungen, wie z.B. die Trisomie 21 mit einem 10- bis 20-fach erhöhten Risiko. [15]. Außerdem scheint es eine genetische Prädisposition zu geben, da Geschwister von Patienten mit akuter Leukämie eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit aufweisen.

Die "2-hit-Hypothese" der Leukämogenese von Gilliland *et al.* [16, 17] geht von einer ersten Mutation aus, durch die Tumorsuppressorgene (Gene, die eine Hemmung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase bewirken) inaktiviert und/ oder Onkogene (an Proliferation beteiligte Gene, deren Mutation oder verstärkte Expression zu maligner Transformation führt) verstärkt exprimiert werden, was zu einer gesteigerten Proliferation mutierter Blasten führt. Die proliferationsfördernden Mutationen involvieren häufig Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sowie proliferationsfördernde Proteine wie FLT3, c-KIT und RAS und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie den WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg oder den PI3K/AKT Signalweg, deren aberrante Aktivierung in akuten Leukämien gezeigt werden konnte [18-20].

Durch ein zweites Genrearrangement von hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren (TF) kommt es zur Repression der Transkription hämatopoetischer Gene und somit zu einem Differenzierungsstopp der Blasten. Das Ergebnis ist ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation, Apoptose und Differenzierungsvorgängen der betroffenen Zellen. In leukämischen Zellen verläuft im Allgemeinen die Proliferation unabhängig von externen Stimuli und somit verstärkt ab, gleichzeitig ist die Apoptose inhibiert und die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen aufgehoben [21, 22].

Tatsächlich gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass ein Differenzierungsstopp und forcierte Proliferation allein für die Leukämogenese nicht ausreichend sind. So gibt es den seltenen Fall der Spenderzellleukämien in 0,1-5% der Fälle. Nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) entwickelt sich eine Leukämie aus der Spenderzellpopulation [23]. Deshalb wird als dritter Faktor in der Leukämogenese eine Veränderung des Mikromilieus der Stammzellnische im Knochenmark angesehen [24].

## Einleitung

Bereits 1978 wurde von Schofield die Existenz einer Stammzellnische im Knochenmark postuliert, in der die Stammzellen lokalisiert sind und ihre Differenzierung inhibiert ist, was für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools notwendig ist [25]. Über die Adhäsion der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) an Knochenmarksstromazellen oder Strukturen der extrazellulären Matrix wird die notwendige räumliche Nähe geschaffen, damit die von den Stromazellen präsentierten Oberflächenmoleküle wie Integrine, Cadherine und Catenine und die sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokine auf den Stammzellpool einwirken können und so die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der HSC regulieren. Deshalb wird postuliert, dass eine Veränderung der Knochenmarksstromazellen, die somit ebenfalls das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose der HSC stört, die Leukämogenese initiieren oder zumindest forcieren kann, indem sie den notwendigen Proliferationsvorteil und die Apoptoseinhibierung mutierter Blasten bewirkt [24]. Die Leukämogenese scheint ein komplexer, durch viele Faktoren beeinflusster Prozess zu sein, dessen näheres Verständnis essentiell für die Entwicklung gezielter Therapieoptionen ist.

### **1.1.3 Klinisches Bild und Diagnostik**

Das klinische Bild der akuten Leukämien ist durch die Zeichen der hämatopoetischen Insuffizienz gekennzeichnet. Die Anämie äußert sich durch Blässe, Müdigkeit und Dyspnoe. Fieber und rezidivierende Infektionen der Haut und Schleimhäute sowie des Respirationstraktes sind Folge der Neutropenie. Schließlich treten Hämatome, Purpura und Blutungen als Resultat der Thrombozytopenie auf [26].

Des Weiteren können Zeichen der Organinfiltration vorhanden sein, wie z.B. Lymphadenopathie, Gingivahyperplasie, Splenomegalie und Knochenschmerzen, die besonders bei Kindern ein Erstsymptom darstellen können. Die Infiltration der Meningen kann zu Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Sehstörungen führen. Seltener kommt es zur mediastinalen Kompression auf Grund einer retrosternalen Manifestation bei T-ALL.

Bei der Blutuntersuchung zeigt sich im Allgemeinen eine normochrome normozytäre Anämie mit Thrombozytopenie. Die Leukozytenzahl kann vermindert, normal oder stark erhöht sein. Im Blutaussstrich lässt sich die erhöhte Anzahl leukämischer Blasten nachweisen.

## Einleitung

Für die Diagnosestellung ist das Vorhandensein eines Blastenanteils (unreife Vorläuferzellen mit netzartiger Chromatinstruktur und großem Nukleolus) von mindestens 20%, bzw. einer der durch die WHO-Klassifikation von 2008 beschriebenen Translokationen im Knochenmarkaspirat Voraussetzung [3].

Die Untersuchung des Knochenmarks hat demnach zum Ziel die leukämischen Blasten nach ihrer Morphologie, Zytochemie und Immuntypisierung, an Hand derer die Einteilung nach der FAB-Klassifikation erfolgt, zu charakterisieren sowie die prognostisch relevanteren zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen zu identifizieren. Zu den zytogenetischen Veränderungen zählen Translokationen, Inversionen und Deletionen, durch die es z.B. zur Bildung von Fusionsgenen, wie dem *BCR-ABL* Gen kommt, dessen Folge eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase mit Proliferationssteigerung mutierter Zellen ist. Molekulargenetische Veränderungen sind z.B. Mutationen im *Nucleophosmin (NPM1)*-Gen, die mit einer guten Prognose assoziiert sind, oder Längenmutationen im *FLT3*-Gen (*FLT3-ITD* - *internal tandem duplications*), die mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind. Der Nachweis dieser Mutation erfolgt mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR) und kann als Remissionsparameter herangezogen werden, da bereits der Nachweis weniger Moleküle der mutierten DNA möglich ist.

### 1.1.4 Therapie

Bei der Therapie der Leukämien wird unterteilt in die Remissionsinduktion und die Konsolidierung. Ziel der Remissionsinduktion ist es, die Tumorlast schnell und drastisch zu senken. Eine Remission liegt vor, wenn der Blastenanteil im Knochenmark unter 5% liegt, die Zellzahl im peripheren Blut normal ist und alle Krankheitszeichen verschwunden sind. Bei der ALL werden in unterschiedlichen Protokollen Prednisolon bzw. Dexamethason in Kombination mit Vincristin (Mitosehemmung), Cyclophosphamid (Alkylierung und resultierende DNA-Strangbrüche) und Asparaginase (Hydrolyse von Asparagin) oder einem Anthrazyklin (Interkalation mit DNA und somit Topoisomerase II-Hemmung) eingesetzt [27]. Das Induktionsschema bei AML (als Induktion bzw. Doppelinduktion) besteht meistens aus einer Kombination des Antimetaboliten Cytosinarabinosid (AraC) über 7 Tage mit einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin) an Tag 3-5 [28-30].

Ziel der Konsolidierungstherapie ist es, in mehreren Zyklen die minimale Resterkrankung (minimal residual disease - MRD) soweit wie möglich zu senken. Dabei

kommen bei der ALL Kombinationschemotherapien im Rahmen genau festgelegter Therapieprotokolle zum Einsatz. Typischerweise werden AraC, Daunorubicin, Vincristin, Methotrexat oder Mercaptopurin in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt [27]. Bei der AML besteht die Konsolidierung meist aus einer Hochdosistherapie mit AraC. Je nach Risikotyp erfolgt außerdem bei Rezidiv oder in erster Remission eine allogene SZT.

### 1.1.5 Entwicklung neuer Therapieoptionen

Die Fünfjahresüberlebenschance für AML liegt bei knapp 22% [2, 4], wobei die Prognose für Personen unter 65 Jahren signifikant besser ist. Dies beruht zum einen auf der besseren gesundheitlichen Gesamtsituation der jüngeren Patienten sowie der Möglichkeit der allogenen SZT, aber auch auf der Biologie der AML in höherem Lebensalter, die vermehrt jene molekularen Veränderungen aufweist, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. So können in der Altersgruppe der unter 65-Jährigen etwa 20-75% der Patienten geheilt werden, wohingegen bei den über 65-Jährigen nur in <10% eine Heilung erreicht werden kann [2, 3]. Somit liegt die Prognose bei den über 65-Jährigen noch bei ähnlichen Raten wie vor 20-30 Jahren. Dies zeigt, dass besonders diese Altersgruppe, die eine höhere Inzidenz der AML aufweist, von einem besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung und damit einhergehenden neuen Therapieoptionen profitieren würde.

Die Prognose der ALL ist stark abhängig vom Alter und der Zytogenetik. Bei Kindern kann in bis zu 70-90% der Fälle eine Heilung erreicht werden. Da aber die ALL die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter ist, bedeutet dies, dass die Rezidivraten der ALL den Neuerkrankungsraten anderer maligner Erkrankungen im Kindesalter nahe kommen. Da die Rezidive gleichzeitig ein schlechteres Therapieansprechen zeigen [31], ist die Therapie und Prognose der ALL immer noch nicht zufriedenstellend.

Auf Grund dieser noch immer sehr schlechten Prognose der akuten Leukämien in höherem Lebensalter und dem schlechten Therapieansprechen im Rezidiv ist die Entwicklung gezielter Therapieoptionen (*targeted therapy*) von besonderer Bedeutung. Unter anderem kann die Identifizierung, an der Leukämogenese beteiligter, molekularer Mechanismen dazu beitragen neue Zielmoleküle für die Therapie mit *small molecules* zu entwickeln.

## Einleitung

Ein Mechanismus, dem eine Bedeutung in der Leukämogenese eingeräumt wird, ist die veränderte Transkriptionsregulation und somit alterierte Expression von Genen. So konnte bereits für mehrere Mitglieder der ETS-TF gezeigt werden, dass eine aberrante Expression dieser Gene zu onkogener und leukämogener Transformation führt. Dies macht die Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorenfamilie besonders interessant für die medizinische Forschung, da die Kenntnis ETS-regulierter Zielgene zu einem besseren Verständnis der Leukämogenese und somit letztendlich zur Entwicklung neuer Therapieoptionen beitragen könnte.

### 1.2 Molekulare Charakterisierung der ETS Transkriptionsfaktoren

Die ETS (E-twenty six) Genfamilie ist eine der größten Transkriptionsfaktorenfamilien. TF sind DNA-bindende Proteine, die den Promotorbereich von Genen binden und in Assoziation mit der RNA-Polymerase die Transkription eines Gens als ersten Schritt der Proteinbiosynthese einleiten.

Beim Menschen sind 29 Mitglieder dieser Familie bekannt. Das namensgebende Gen wurde identifiziert als ein durch das Leukämievirus E26 transduziertes Gen. *ETS*-Gene haben eine hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne (Abbildung 1 – ETS [32]), die spezifisch eine zentrale GGAX Sequenz erkennt [32]. Außerdem weisen sie die *Pointed Proteinstruktur* auf (Abbildung 1 - HLH), eine Helix-Loop-Helix-Struktur mit einem flügelähnlichen Seitenarm, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist [33], was vermuten lässt, dass einige dieser Proteine direkt mit anderen Proteinen interagieren und so die Funktion der *ETS*-Gene reguliert werden kann.

ETS (ETS1, ETS2) 

AD	HLH		ETS	ID
----	-----	--	-----	----

ERG (ERG, FLI-1, FEV) 

AD	HLH		ETS	ID
----	-----	--	-----	----

**Abb. 1: Darstellung des schematischen Aufbaus von ETS-Proteinen.** Gezeigt ist der Aufbau von ETS-Proteinen mit der DNA-Bindungsdomäne (ETS), der Pointed-Domäne (HLH) für die Protein-Protein-Interaktionen sowie der Aktivierungsdomäne und der Inhibierungsdomäne für die Regulation der DNA-Bindung [32].

Weiterhin werden *ETS*-Gene durch Phosphorylierung reguliert. Kinasen des MAPK Signalwegs phosphorylieren und aktivieren ETS-TF wie z.B. ELK-1 und haben somit Einfluss auf die Expression von Genen [34]. *ETS*-Gene sind einzigartig für das Tierreich und kommen in den einfachsten multizellulären Organismen, wie z.B. dem Schwamm *T.*

*aurantia*, vor. Allerdings sind sie nicht in einzelligen Organismen zu finden [35]. Dies lässt vermuten, dass die ersten *ETS*-Gene Prozesse regulierten, die für multizelluläre Organismen essentiell sind [36]. Sie modulieren Funktionen wie Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose [37, 38].

Die aberrante Expression dieser Gene wurde mit verschiedenen hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren in Zusammenhang gebracht und als ursächlicher Faktor onkogener Transformationen betrachtet [39, 40]. So besitzen 95% der Ewing Sarkome und einige maligne hämatopoetische Erkrankungen chromosomale Translokationen von *ETS*-Genen, deren Amplifikation oder verstärkte Expression demnach an Onkogenese und Leukämogenese beteiligt sein könnte [38, 39].

Zusammenfassend sind *ETS*-Gene essentielle Bestandteile multizellulärer Organismen, können aber wenn dereguliert, zur malignen Transformationen beitragen, da sie Prozesse wie Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Auf Grund dieser Eigenschaften befinden sie sich immer wieder im Fokus wissenschaftlicher Forschung, da ein besseres Verständnis ihrer Funktionen die Vorgänge der Onkogenese genauer beleuchten könnte.

### 1.3 Der *ETS* Transkriptionsfaktor *ERG*

#### 1.3.1 Struktur und Regulationsmechanismen

Das Protein V-ETS Avian Erythroblastosis Virus E26 oncogene homolog (Genbank Accession: M21535) gehört zu den *ETS*-TF und ist ein Onkogen [41]. Das *ERG*-Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert [42], umfasst mindestens 17 Exons und ist 282 Kilobasenpaare (kbp) groß [43]. Es kommt in mindestens 5 Splicevarianten vor [44]. *ERG*-Isoformen bilden Homo-, aber auch Heterodimere mit anderen *ETS*-Proteinen, wie z.B. *FLI-1* oder Proteinen der *JUN*-Transkriptionsfaktorfamilie über die Pointed-Proteindomäne [45, 46]. Diese Form der Protein-Protein-Interaktion ist eine Regulationsmöglichkeit der *ERG*-Aktivität.

Des Weiteren scheint es eine epigenetische Regulation von *ERG* zu geben. Es gibt zwei Hauptisoformen, *ERG2* und *ERG3*, von denen erstere durch Methylierung reguliert wird, wohingegen sich kein CpG Island in der Promotorregion von *ERG3* findet und diese Isoform somit anderen Regulationsmechanismen unterliegt [47]. Es konnte eine Regulation der *ERG*-mRNA auf posttranskriptionaler Ebene durch die microRNA (miRNA) Moleküle miR-196a und miR-196b gezeigt werden. Eine Überexpression

dieser miRNAs in leukämischen Zelllinien bewirkte eine verminderte Expression der mRNA für *pan ERG* und der Isoformen *ERG2* und *ERG3* [48].

### 1.3.2 Physiologische Funktion

Physiologische Funktionen konnten für ERG in der Hämatopoese [49], Angiogenese [50] und skelettalen Entwicklung [51] gezeigt werden. *ERG* ist in hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryoblasten, Thrombozyten und megakaryoblastischen Leukämiezelllinien exprimiert [52].

Salek *et al.* konnten zeigen, dass ERG die Megakaryopoese fördert. Mit *ERG* transfizierte hämatopoetische Progenitorzellen (HPC), gewonnen aus fetaler Leber, bildeten CD41<sup>+</sup> Kolonien. Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch Stankiewicz *et al.* an HPC ohne Expression von *Gata1* (*Gata1 knock down*) gezeigt werden. Transfektion von diesen HPCs mit *ERG* führte zu einer verstärkten Expression von megakaryozytischen Genen wie *GPIIB*, *PF4*, und *β1-tubulin*. Außerdem waren Gene wie *CyclinD1*, *Spfi,1* *Runx1*, *Jak2*, und *Gata3*, die Zellzyklus und Proliferation regulieren, vermehrt exprimiert und Gene wie *Klf1*, *Lmo2*, *Hbb-b1*, *Gypa*, *Egr1*, *Ank1* und *Eraf*, welche mit erythroider Differenzierung assoziiert sind, waren vermindert exprimiert [53]. Dies lässt vermuten, dass ERG die Differenzierung in Richtung Megakaryopoese fördert.

ERG ist außerdem wichtig für die embryonale Hämatopoese. So sterben Mäuse mit homozygoter Mutation von *ERG* bereits *in Utero* und aus ihren Dottersackzellen können fast keine hämatopoetischen Kolonien gezüchtet werden. Adulte Mäuse, die heterozygot für diese *ERG*-Mutation sind, weisen eine Anämie, Thrombozytopenie, Leukozytopenie und reduzierte Stammzellpopulation auf [49]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine frühe embryonale Hämatopoese ERG-unabhängig stattfindet, dass ERG aber unabdingbar ist für die Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen hämatopoetischen Stammzellpools [54].

Des Weiteren ist *ERG* in frühen CD4<sup>-</sup>/ CD8<sup>-</sup> negativen T-Zellen exprimiert und wird während der weiteren T-Zell Differenzierung nicht mehr exprimiert. Eine Überexpression von *ERG* in diesem frühen Stadium der T-Zellentwicklung bewirkt einen Differenzierungsstopp [55]. Diese Arbeiten zeigen, dass ERG in der frühen Hämatopoese entscheidend für die Differenzierung der verschiedenen hämatopoetischen Linien ist, in der späteren Hämatopoese aber eine untergeordnete Rolle spielt und bei aberranter Expression die Differenzierung inhibiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *ERG* in der Entwicklung und Differenzierung embryonaler Stammzellen mit *VE-Cadherin* koexprimiert wird und die Expression auf endotheliale Zellen beschränkt ist. Eine Reduktion der *ERG*-Expression durch *knock down* um bis zu 85% in den frühen endothelialen Zellen ging mit einer verminderten Anzahl von Endothelzellen und weniger Gefäßneubildung einher. Dies deutet an, dass ERG sowohl für die Proliferation als auch für die Differenzierung dieser Zellen verantwortlich ist [56].

Schließlich wurden für ERG antiinflammatorische Effekte nachgewiesen. Yuan *et al.* konnten zeigen, dass ein *knock down* von *ERG* zu einer vermehrten Expression von *IL-8* auf der Oberfläche endothelialer Zellen führt, was wiederum eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten und somit erhöhte Inflammation zur Folge hat. Analog dazu führt die Behandlung endothelialer Zellen mit TNF- $\alpha$ , einem proinflammatorischen Zytokin, zu einer verminderten Expression von *ERG* und damit vermehrter *IL-8* Expression. Die Bindung von ERG an den *IL-8* Promotor konnte durch Chromatin-Immunopräzipitation gezeigt werden und impliziert somit eine Transkriptionsrepression dieses Gens durch ERG [57].

### 1.3.3 Onkogene Potenz und prognostische Bedeutung

Bereits 1995 konnte die onkogene Potenz von ERG durch Hart *et al.* gezeigt werden. Sie transfizierten murine Fibroblasten (NIH3T3) mit *ERG2*-cDNA tragenden Vektoren. Die so veränderten Zellen wiesen morphologische Veränderungen auf und zeigten Wachstum in serumfreiem Medium, also ein von Wachstumsfaktoren unabhängiges Überleben. Ferner entwickelten sich diese Zellen bei thymusaplastischen Mäusen nach subkutaner Injektion zu soliden Tumoren [58].

Kinder mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) zeigen ein 10- bis 20-fach erhöhtes Risiko, an einer Leukämie zu erkranken [15, 59]. Da *ERG* auf Chromosom 21 lokalisiert ist, ist dies ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von ERG an der Leukämogenese beim Down-Syndrom (DS) [60]. Besonders stark erhöht ist die Inzidenz der akuten megakaryoblastischen Leukämie (AMKL – AML M7) bei DS mit einer bis zu 500-fachen Erhöhung gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe [61]. Allerdings weisen fast alle Kinder mit DS, die eine AMKL entwickeln, eine Mutation des TFs *GATA1* auf, die zu der Synthese eines verkürzten *GATA1* Proteins und somit zu Veränderungen in der Transkriptionsregulation führt [62]. Da das *GATA1*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Kombination der *GATA1*-Mutation mit



## Einleitung

der Trisomie bestimmter Gene auf Chromosom 21 zur Herausbildung dieser AMKL führt. Allerdings sind neben *ERG* noch andere Leukämie-assoziierten Gene (*RUNX1*, *ETS2*) auf Chromosom 21 lokalisiert, so dass die Relevanz der *ERG*-Trisomie bislang unklar geblieben ist. In einem Mausmodell mit Trisomie 21 und funktioneller Disomie von *ERG* konnte gezeigt werden, dass die Trisomie von *ERG* eine Voraussetzung der Leukämogenese bei Trisomie 21 ist [63].

Im Mausmodell konnten Salek *et al.* eine *ERG*-vermittelte Leukämie induzieren. Mäuse, deren Knochenmark bestrahlt worden war, wurden mit HPC transplantiert. Diese HPC waren zuvor mit einem *ERG*-Expressionsvektor bzw. einem Kontrollvektor transduziert worden. Jene Mäuse, die HPC mit vermehrter *ERG*-Expression erhalten haben, entwickelten innerhalb von 100 Tagen eine AML, wohingegen die Kontrollgruppe nicht erkrankte.

Die Translokation t(16;21)(p11;q22) mit Bruchpunkt im *ERG*-Locus ist mit AML [64], CML in Blastenkrise [65] und MDS nach Übergang in eine AML [66] assoziiert [67]. Es entsteht ein Fusionsgen zwischen der 5´Region des *TLS/FUS*-Gens und der 3´Region des *ERG*-Gens. Dabei wird die RNA-Bindungsdomäne des *TLS/FUS*-Gens mit der DNA-Bindungsdomäne von *ERG* ausgetauscht [68]. In einer Studie mit 19 Patienten mit dieser Translokation zeigte sich, dass der Altersdurchschnitt mit 22 Jahren unter dem der AML im Allgemeinen liegt und dass die Prognose mit einer Überlebenszeit von höchstens 3 Jahren schlecht ist [69]. In vitro führte die Transduktion humaner Nabelschnurzellen mit *TLS/FUS-ERG* zu einer veränderten myeloischen und arretierten erythroiden Differenzierung sowie einer vermehrten Proliferation [70]. Diese Resultate legen nahe, dass die *ERG*-assoziierte Leukämie spezielle Therapien braucht um die derzeit schlechte Prognose zu verbessern.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Höhe der *ERG* mRNA-Expression leukämischer Blasten bei Erstdiagnose als prognostischer Parameter der Leukämie von Bedeutung ist. Eine hohe *ERG* mRNA-Expression ist mit einer schlechteren Prognose sowohl in AML als auch in T-ALL assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass T-ALL Patienten mit hoher *ERG*-Expression eher ein Rezidiv erlitten und eine geringere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit hatten als solche mit geringer *ERG*-Expression [71]. AML-Patienten mit normalem Karyotyp und hoher *ERG*-Expression erlitten häufiger ein Rezidiv und hatten ein geringeres Gesamtüberleben [72, 73]. Analog zeigten Patienten mit zytogenetisch normaler AML und hoher *ERG*-Expression seltener eine komplette Remission und ein geringeres rezidivfreies Überleben als jene mit niedriger *ERG*-

Expression [74, 75]. Das Wissen um die schlechtere Prognose bei hoher *ERG*-Expression kann zu einer Optimierung der Therapie dieser Patienten beitragen, z.B. Stratifizierung der Therapieprotokolle oder SZT in erster kompletter Remission.

Mutationen mit Einbeziehung des *ERG*-Lokus werden auch bei soliden Tumoren gefunden. Die Mikrodeletion zwischen *ERG* und *TMPRSS2* auf Chromosom 21 wird bei 50 % aller Prostata Tumoren gefunden [76] und führt zu einer verstärkten Expression von *ERG* in diesen Zellen [77]. Dies beruht wahrscheinlich auf einer androgen-abhängigen Regulation der *ERG*-Expression, da *ERG* als Ergebnis dieser Translokation unter den Einfluss der *androgen responsive regulatory elements* gestellt wird [77]. Des Weiteren ist eine Duplikation des *TMPRSS2-ERG*-Fusionsgens mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert, was wahrscheinlich auf die erhöhte Expression von *ERG* in diesen Fällen zurückzuführen ist [78, 79]. In einem Mausmodell zeigten Tiere mit vermehrter *ERG*-Expression einen Verlust der basalen Epithelschicht und eine frühere Entstehung von intraepithelialen Neoplasien der Prostata (PINs) [80]. Schließlich haben Patienten, die sowohl *TMPRSS2-ERG* positiv sind, als auch einen Verlust des *PTEN*-Gens aufweisen, eine weitere sehr häufige Mutation beim Prostatakarzinom, eine besonders schlechte Prognose im Vergleich zu jenen mit nur einer der beiden Mutationen. Patienten, die keine der beiden Mutationen aufweisen, haben eine vergleichsweise günstige Prognose [81].

Eine weitere *ERG*-assoziierte Translokation t(21;22) fusioniert *ERG* mit dem *EWS*-Gen auf Chromosom 22 und ist bedeutsam für die Pathogenese des Ewing Sarkoms, eines soliden mesenchymalen Tumors des Kindesalters [82].

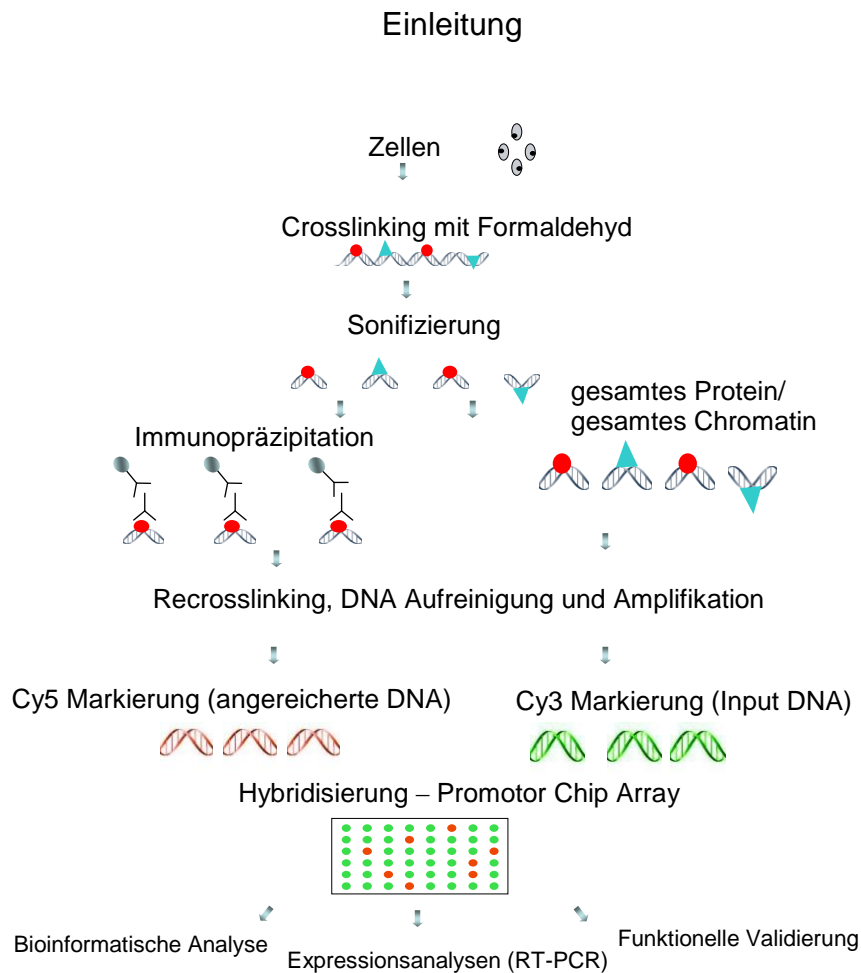
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ERG* eine relevante Rolle in der zellulären Entwicklung, besonders der frühen Hämatopoese spielt und Fehlregulationen der Expression dieses Gens an Leukämogenese und Onkogenese beteiligt sind. Ferner kann die Höhe der *ERG*-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor bei Leukämien und soliden Tumoren herangezogen werden. Allerdings ist bisher unbekannt, durch welche Gene *ERG* seine physiologischen und pathologischen Funktionen ausübt.

### **1.4 Targetidentifizierung: Chromatin-Immunopräzipitation on chip**

TF üben ihre Funktion über die Regulation der Expression von Genen aus. Deshalb gibt die Identifikation von Targetgenen eines TF Aufschluss über seine biologischen Funktionen und seine Bedeutung in den Zellen. Daher ist es von Interesse, die durch

## Einleitung

einen TF gebundenen Gene zu identifizieren, da diese mögliche Ziele spezifischer Therapieoptionen bei aberranter Expression des TF sein könnten. Eine molekulargenetische Methode ist das „ChIP-chip“ Verfahren [83]. Bei dieser Technologie wird die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit der Hybridisierung auf DNA Microarrays (chip) kombiniert. Das generelle Prinzip ist, dass die DNA fragmentiert wird und mittels eines spezifischen Antikörpers die durch den TF gebundenen DNA-Abschnitte von der übrigen DNA separiert werden. Die so immunopräzipitierten DNA-Fragmente werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit einer anders markierten Kontrollprobe gemischt. Bei der gemeinsamen Hybridisierung auf ein Array, das speziell ausgewählte Oligonukleotide enthält, konkurrieren die immunopräzipitierten DNA-Fragmente mit der Kontroll-DNA um die Bindung an die jeweils komplementären Oligonukleotide auf dem Array. Da von der immunopräzipitierten und der Kontrollprobe die gleiche DNA-Gesamtmenge eingesetzt wird, sind in der immunopräzipitierten Probe die durch den TF gebundenen DNA-Abschnitte überrepräsentiert und somit angereichert. Daher binden sie statistisch gesehen häufiger an die jeweiligen Oligonukleotide des Arrays, so dass für diese Bereiche die Fluoreszenzintensität der immunopräzipitierten Proben intensiver ist, als die der Kontrolle (Abbildung 2). Anschließend kann die Anreicherung der Promotoren mutmaßlicher Targetgene mittels qrt-PCR validiert werden bzw. die Auswirkung einer *ERG*-Modulation auf deren Expression. Die Listen signifikanter Targetgene können bioinformatisch auf eine Anreicherung von Funktionen und Signalwegen innerhalb der Genlisten analysiert werden.



**Abb. 2: Schematischer Ablauf eines ChIP-chip Versuchs.** Die Chromatin-Immunopräzipitation ist gefolgt von der Hybridisierung auf einen Promotorarray und der anschließenden Analyse und Validierung der akquirierten Daten.

Vor Einführung dieses Verfahrens war es lediglich möglich Protein-DNA-Interaktionen bei einer limitierten Anzahl von bekannten oder vermuteten Zielgenen zu untersuchen. Kritische Punkte des ChIP-chip Verfahrens sind vor allem die Spezifität des Antikörpers, die Auswahl eines geeigneten Arrays und die Wahl der statistischen Methoden zur Auswertung der Daten.

Möglich ist die Verwendung von Arrays, die die humanen Promotorregionen oder *CpG-Islands* abbilden. Diese Arrays eignen sich für die Identifikation von Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die sich vor allem in den Promotorregionen befinden. Allerdings kann eine solche Vorauswahl der Oligonukleotide zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen, so dass signifikante Anreicherungen nicht ins Gewicht fallen. Eine alternative Methode ist die Anwendung von *Tiling Arrays*. Bei diesen wird keine Vorauswahl der Oligonukleotide getroffen, sondern es wird das gesamte Genom überlappend repräsentiert. Diese Arrays eignen sich für genomweite

## Einleitung

Analysen der Genregulation. Sie sind allerdings für das humane Genom sehr kostenintensiv, da etwa 3 Millionen Oligonukleotide notwendig sind, um die rund 25.000 humanen Gene zu repräsentieren [84]. Des Weiteren können Histon-basierte ChIP-chip Verfahren genutzt werden, um den Aktivierungsgrad des Chromatins zu untersuchen bzw. das Ausmaß der Polymeraseaktivität zu ermitteln. Dabei macht man sich zu nutze, dass die Histone aktiver Gene verstärkt azetyliert sind, so dass man z. B. einen Antikörper gegen hyperazetyliertes Histon H4 einsetzen kann [85]. Die so ermittelten DNA-Fragmente gehören zu Genen, die in den untersuchten Zellen aktiv sind.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Auswahl geeigneter Kontrollverfahren. So eignet sich z.B. die Verwendung einer Zelllinie, die das zu untersuchende Protein nicht exprimiert [84]. Andere Möglichkeiten sind die Verwendung von unspezifischen Antikörpern oder die Verwendung der Agarosebeads ohne Antikörper (Mock) sowie der Einsatz des gesamten genomischen Lysats (Input).

Abschließend lässt sich sagen, dass das ChIP-chip Verfahren eine gute Methode ist, um Targetgene von jenen TF zu identifizieren, deren funktionelle Bedeutung bislang noch relativ wenig beleuchtet worden ist. Jedoch sollte man bei der Auswertung und Beurteilung der ChIP-chip Daten stets bedenken, dass es ein Screeningverfahren darstellt, dessen Ergebnisse nur im Zusammenhang mit weiteren Validierungen und funktionellen Testverfahren gesehen werden sollte.

## 2. Fragestellung

ERG ist ein TF, der die Megakaryopoese fördert und essentiell für den Erhalt einer normalen Hämatopoese ist [49, 53]. Ferner ist *ERG* vor allem in frühen zellulären Entwicklungsstufen der Hämatopoese, aber auch der Angiogenese und epithelialen Entwicklung exprimiert [50, 55, 56]. Eine aberrante Expression dieses Gens kann bei soliden Tumoren gefunden werden und stellt einen unabhängigen ungünstigen prognostischen Faktor bei akuten Leukämien dar [63, 80, 82].

Bisher sind nur wenige ERG-regulierte Gene in akuten Leukämien bekannt, so dass eine Identifizierung weiterer Targetgene zur Entwicklung neuer Therapieoptionen bei akuten Leukämien, z.B. in Form von spezifischen Inhibitoren der deregulierten Proteine, beitragen könnte. Deshalb ist es Ziel dieser Arbeit, die durch ERG regulierten Gene und die mit diesen zusammenhängenden Signalwege und zellulären Funktionen zu identifizieren.

### **Identifizierung von Targetgenen mittels ChIP-chip**

Für die Identifizierung dieser Gene wird die ChIP-chip Methode angewendet, ein Verfahren um proteingebundene DNA-Abschnitte anzureichern. Dies wird sowohl an der T-ALL Zelllinie Jurkat als auch an primären leukämischen Blasten von 6 Patienten durchgeführt, um Unterschiede der ERG-Funktion *in vivo* und *in vitro* zu ermitteln und intraindividuelle Disparitäten aufzudecken.

### **Validierung mutmaßlicher Targetgene**

Identifizierte, mutmaßliche Targetgene sollen zum einen mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR) auf die Anreicherung der Promotoren validiert und anschließend mittels reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) an Zellen mit verminderter (*knock down*) und induzierter *ERG*-Expression auf eine ERG-abhängige Veränderung ihrer Expression hin untersucht werden.

### **Resistenzbestimmungen**

Um eine mögliche klinische Relevanz zu eruieren sollen anschließend Inhibitoren gegen identifizierte Targetgene mittels Proliferationstest auf ihre Wirksamkeit überprüft werden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von Targetgenen des TF ERG. Die Erprobung spezifischer Inhibitoren *in vitro* könnte Hinweise zu Möglichkeiten der Therapiestratifizierung bei akuten Leukämien mit hoher *ERG*-Expression liefern.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Feststoffe

<b>Stoff</b>	<b>Hersteller</b>
NaCl	Merck
NaF	Roth
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
Na-Orthovanadate	Sigma
LiCl	Sigma
Glycin	Roth
Tris-HCl	Roth
Deoxycholicacid	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
EDTA	Sigma
Agarose	Gibco

##### 3.1.2 Flüssigkeiten

<b>Stoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Formaldehyd	Sigma	37%
Nonidet P-40	Fluka BioChemika	100%
Triton-X	Sigma	100%
Ethanol	Sigma	100%
PBS Dulbecco	Biochrom AG	

##### 3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI-1640	Gibco	
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA	10%
Anti-anti	Gibco	1%
Puromycin	Merck	1,25 µg/ ml
G418	Gibco	800 ng/ ml
Doxycyclin	Clonetech	1 mg/ ml
WST-1 Reagenz	Roche	

##### 3.1.4 Kinaseinhibitoren

BAY 43-9006 (Sorafenib)	Enzo Life Sciences
BIO	Merck
SL327	Biaffin
U0126	Biaffin
SP600125	Biaffin
SB203580	Biaffin
PD98059	Biaffin

### 3.1.5 Puffer

Reagenz	Konzentration/ Menge	Volumen
<b>TAE-Puffer</b>		
Tris Base	242 g	
Eisessig	100%	57,1 ml
EDTA	0,5 M	100 ml
H <sub>2</sub> O		auf 1 l auffüllen
<b>Laufpuffer</b>		
Saccharose	4 g	
EDTA	0,5 M	100 µl
Bromphenolblau	2 %	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	Differenz zu 10 ml	
<b>RIPA Puffer</b>		
NaCl	5 M	1,5 ml
Nonidet P-40	100%	0,5 ml
Deoxycholot	10%	2,5 ml
SDS	10%	0,5 ml
Tris-HCl pH 8,0	1 M	2,5 ml
H <sub>2</sub> O		42,5 ml
Inhibitoren (frisch zubereiten)		
NaF	1 M	2,5 ml
Na-Orthovanadate	200 mM	50 µl
Trichostatin	3 mM	50 µl
Protease Inhibitor Cocktail tablet	1x	
<b>Low Salt Puffer</b>		
SDS	10%	0,5 ml
Triton-X	100%	0,5 ml
EDTA	0,5 M	0,2 ml
Tris-Cl pH 8,1	1 M	1 ml
NaCl	5 M	1,5 ml
H <sub>2</sub> O		46,3 ml
<b>High Salt Puffer</b>		
SDS	10%	0,5 ml
Triton-X	100%	0,5 ml
EDTA	0,5 M	0,2 ml
Tris-Cl pH 8,1	1 M	1 ml
NaCl	5 M	5 ml
H <sub>2</sub> O		42,8 ml
<b>LiCl Puffer</b>		
LiCl	539 mg	
Nonidet P-40	100%	0,5 ml
Deoxycholot	10%	0,5 ml



## Materialien und Methoden

EDTA	0,5 M	0,1 ml
Tris-Cl pH 8,1	1 M	0,5 ml
H <sub>2</sub> O		
<b>TE Puffer</b>		
Tris-CL pH 8,0	1 M	0,5 ml
EDTA	0,5 M	0,1 ml
H <sub>2</sub> O		49,4 ml
<b>Trenngel für Western-Blot</b>		
Puffer (pH 8,8)		5 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid		7,5 ml
Wasser		7,5 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)		150 µl
Temed		15 µl
<b>Sammelgel für Western-Blot</b>		
Puffer (pH 6,8)		2,5 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid		1 ml
Wasser		6,5 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)		100 µl
Temed		20 µl
<b>Waschpuffer 1 (Prähybridisierung)</b>		
Triton x	100%	1 ml
H <sub>2</sub> O		1 l
<b>Waschpuffer 2 (Prähybridisierung)</b>		
HCl	37%	86 µl
H <sub>2</sub> O		1 l
<b>Waschpuffer 3 (Prähybridisierung)</b>		
KCl	1 M	110 ml
H <sub>2</sub> O		900 ml
<b>Blocklösung</b>		
HCl	37%	8 µl
Nexterion Block E	4x	10 ml
H <sub>2</sub> O		30 ml
<b>Waschpuffer 1 (Posthybridisierung)</b>		
SSC	20x	100 ml
SDS	10%	20 ml
H <sub>2</sub> O		880 ml
<b>Waschpuffer 2 (Posthybridisierung)</b>		
SSC	20x	10 ml
SDS	10%	10 ml
H <sub>2</sub> O		980 ml

## Materialien und Methoden

### Waschpuffer 3 (Posthybridisierung)

SSC	20x	10 ml
H <sub>2</sub> O		990 ml

### 3.1.6 Antikörper

Name	Hersteller
Normal Rabbit IgG	Santa Cruz
ERG-1/2/3 (C17)	Santa Cruz
ERG-1/2/3 (C20)	Santa Cruz
Protein A/G Plus-Agarose beads	Santa Cruz

### 3.1.7 Enzyme

Name	Hersteller	Konzentration
Complete Mini - Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche	
Ribonuclease A	Qiagen	100 mg/ ml
Proteinase K	Fermentas	20 mg/ ml

### 3.1.8 Reagenzien für Polymerasekettenreaktion

#### Polymerasekettenreaktion

AmpliTaq Gold®	Applied Biosystems	5 U/ µl
10x PCR Buffer	Applied Biosystems	
Desoxyribonukleotide (Roti-Mix PCR3)	Carl Roth + Co.KG	10 mM

#### Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion

AMV Reverse Transkriptase®	Roche	22 U/ µl
5x Incubation Buffer for AMV Reverse Transkriptase	Roche	
Protector RNase Inhibitor	Roche	40 U/ µl

### 3.1.9 Primer

#### qrt-PCR Promotor Primer

Accession no.	Gen	Primer	Sequenz 5' - 3'	Amplikongröße (bp)	ETS-Konsensussequenz
BC005839	<i>FSTL3</i>	<b>CH47 FSTL3 Fw</b>	GACCGCCGTTCTGCTGACCA	221	ja
	<i>FSTL3</i>	<b>CH48 FSTL3 Rev</b>	AGACTCGAACGTCAGACGGA		
NM_053056	<i>CCND1</i>	<b>CH51 CCND1 Fw</b>	TACTCCCCACCACTTGGTCT	161	ja
	<i>CCND1</i>	<b>CH52 CCND1 Rev</b>	CTGAAGGCGCAACTCTTGAG		
NM_005806	<i>OLIG2</i>	<b>CH57 OLIG2 Fw</b>	ACGCCTCCAGGACGCACCAG	118	ja
	<i>OLIG2</i>	<b>CH58 OLIG2 Rev</b>	TGCCAATCGGATGCTGAGTA		
BC078170	<i>WNT2</i>	<b>CH63 WNT2 Fw</b>	AAGGGAGGGGAGGGAAACAAG	119	ja
	<i>WNT2</i>	<b>CH64 WNT2 Rev</b>	CGCAGACCAAGCAGAACTTC		
NM_014276	<i>RBPJL</i>	<b>CH68 RBPJL Fw</b>	AGGTCAGGGCAACTCTACCT	167	ja
	<i>RBPJL</i>	<b>CH69 RBPJL Rev</b>	CTTCGACCTCATCCAGGAGT		
NM_006037	<i>HDAC4</i>	<b>CH74 HDAC4 Fw</b>	TGTCAAAGGCGCTTCCTC	108	ja
	<i>HDAC4</i>	<b>CH75 HDAC4 Rev</b>	GGTGGTGATGTTTCCGTTTC		
BC112199	<i>ERBB4</i>	<b>CH76 ERBB4 Fw</b>	ACGCTCGGAGCTTAATTACC	157	ja
	<i>ERBB4</i>	<b>CH77 ERBB4 Rev</b>	TTCTGCTCCTTCTCAGTTTCC		

## Materialien und Methoden

NM_003152	<i>STAT5A</i>	<b>CH84 STAT5A Fw</b>	CCAGAGGAGAGGGAAGCTG	<b>138</b>	ja
	<i>STAT5A</i>	<b>CH85 STAT5A Rev</b>	CCTTGCCACAGCAGTGAATA		
NM_153425	<i>TRADD</i>	<b>CH88 TRADD Fw</b>	TGTACACAAGGCTTCACACTACTCG	<b>101</b>	ja
	<i>TRADD</i>	<b>CH89 TRADD Rev</b>	TCTGAAGCCCCAGGAAACAC		
NM_170713	<i>RASSF1</i>	<b>CH90 RASSF1 Fw</b>	GGATCTTGAATGTGGTCTCAGGA	<b>103</b>	ja
	<i>RASSF1</i>	<b>CH91 RASSF1 Rev</b>	TGGCACTGTAGAGAAAACCAAGA		
NM_004764	<i>PIWIL1</i>	<b>CH92 PIWIL1 Fw</b>	CCTGGCACCTTAGACTTGCATT	<b>109</b>	nein
	<i>PIWIL1</i>	<b>CH93 PIWIL1 Rev</b>	TCGATCTTGGTCTGGCCTTT		
BC074791	<i>WNT11</i>	<b>CH94 WNT11 Fw</b>	CGAATTGCCCCAGCTTACTG	<b>150</b>	ja
	<i>WNT11</i>	<b>CH95 WNT11 Rev</b>	TGGGGCTTATCCCTGCAATA		
NM_000474	<i>TWIST1</i>	<b>CH96 TWIST1 Fw</b>	GCTGCAGACTTGAGGCTCT	<b>127</b>	ja
	<i>TWIST1</i>	<b>CH97 TWIST1 Rev</b>	GGGACTGGAAAGCGGAAACT		
NM_003790	<i>TNFRSF25</i>	<b>CH98 TNFRSF25 Fw</b>	GAAAGGGAAAATCGGTGTGG	<b>106</b>	ja
	<i>TNFRSF25</i>	<b>CH99 TNFRSF25 Rev</b>	TTGCACCTCATACCTACCTCA		
BC013297	<i>CD7</i>	<b>CH106 CD7 Fw</b>	AGGCACAGGTCTCCCTCAGC	<b>103</b>	ja
	<i>CD7</i>	<b>CH107 CD7 Rev</b>	CGGGAGGTCTGAGGTATGGTC		
NM_057158	<i>DUSP4</i>	<b>CH108 DUSP4 Fw</b>	GTAACCGGGAAAAACCTACGG	<b>104</b>	ja
	<i>DUSP4</i>	<b>CH109 DUSP4 Rev</b>	AAGGAAATAGCCGGCTGAGG		
NM_000799	<i>EPO</i>	<b>CH110 EPO Fw</b>	ACTAGACGGTGAGGAGTGAGGTG	<b>150</b>	ja
	<i>EPO</i>	<b>CH111 EPO Rev</b>	CTTTAGGGAGGGGCAAATGAGT		
BC001103	<i>GULP1</i>	<b>CH120 GULP1 Fw</b>	CGGAGCAGGCAGTTCTCTCTAT	<b>171</b>	ja
	<i>GULP1</i>	<b>CH121 GULP1 Rev</b>	TCTACCTTGGCACGCTAGTTCC		
NM_033224	<i>PURB</i>	<b>CH122 PURB Fw</b>	AGACTGGAACCTGTGCCAGCA	<b>150</b>	ja
	<i>PURB</i>	<b>CH123 PURB Rev</b>	CGTCTGTCTACGCGCTCTTC		
U66306	<i>RXRA</i>	<b>CH124 RXRA Fw</b>	AAAAGTCAGGCAGAGAACTACCC	<b>116</b>	nein
	<i>RXRA</i>	<b>CH125 RXRA Rev</b>	ACTCCTGGGACCCCTCTTCA		
BC029364	<i>ICAM4</i>	<b>CH126 ICAM4 Fw</b>	GGTTTCTAATGAGGCCTGGA	<b>109</b>	ja
	<i>ICAM4</i>	<b>CH127 ICAM4 Rev</b>	GACTCCACCCTGGAGAGGAA		
NM_003108	<i>SOX11</i>	<b>CH128 SOX11 Fw</b>	GAGAGCTTGGAAAGCGGAGAG	<b>187</b>	ja
	<i>SOX11</i>	<b>CH129 SOX11 Rev</b>	CGGAGACTGCTCCATGATCT		
AK075419	<i>UBAC2</i>	<b>CH130 UBAC2 Fw</b>	AGGACCTGTCCACCTCTCC	<b>161</b>	ja
	<i>UBAC2</i>	<b>CH131 UBAC2 Rev</b>	AATCTCTCCCAGACTGGAC		
NM_001201	<i>BMP3</i>	<b>CH132 BMP3 Fw</b>	AGAGGCTCGGGAAAGTAAGC	<b>118</b>	ja
	<i>BMP3</i>	<b>CH133 BMP3 Rev</b>	TGTGTGGTGGCTAGCAAGAG		
NM_003395	<i>WNT9A</i>	<b>CH134 WNT9A Fw</b>	CTCCTTGAGGGGGTCAGCAT	<b>137</b>	ja
	<i>WNT9A</i>	<b>CH135 WNT9A Rev</b>	CTCCTTGAGGGGGTCAGCAT		
BC010507	<i>CD14</i>	<b>CH146 CD14 Fw</b>	AGGGTTCACAGAGGAGGAACT	<b>172</b>	ja
	<i>CD14</i>	<b>CH147 CD14 Rev</b>	CGATAAGTCTTCCGAACCTCTGA		
BC019270	<i>CDC42EP3</i>	<b>CH148 CDC42EP3 Fw</b>	GCTTATTCCACTCTCCGGGTTT	<b>205</b>	nein
	<i>CDC42EP3</i>	<b>CH149 CDC42EP3 Rev</b>	AACAGGCCGACCTAGCTGTG		
NM_003507	<i>FZD7</i>	<b>CH176 FZD7 Fw</b>	GCACCAGGAAGAGGAACAAATC	<b>100</b>	ja
	<i>FZD7</i>	<b>CH177 FZD7 Rev</b>	GGAGGGAAAAGTTCGGAAAAAC		
NM_002052	<i>GATA4</i>	<b>CH180 GATA4 Fw</b>	TTCATTTGAAGCGTGGAAGAAG	<b>104</b>	ja
	<i>GATA4</i>	<b>CH181 GATA4 Rev</b>	GGGTCCTAAAAGAGGAACGACA		
NM_031866	<i>FZD8</i>	<b>CH186 FZD8 Fw</b>	TGGAACCTCTGCAAGGCAGT	<b>151</b>	ja
	<i>FZD8</i>	<b>CH187 FZD8 Rev</b>	TACACCTCAGCAATGCGTTC		
NM_001261	<i>CDK9</i>	<b>CH192 CDK9 Fw</b>	GGAGTGCCCTTTTTGTGATG	<b>169</b>	nein
	<i>CDK9</i>	<b>CH193 CDK9 Rev</b>	CAGACGACTTCTCTACCAACTCG		

## Materialien und Methoden

### RT-PCR Primer

Accession no.	Gen	Primer	Sequenz 5' - 3'	Amplikongröße (bp)
BC078170	<i>WNT2</i>	<b>CH100 WNT2(RT) Fw</b>	CCGAGGTCAACTCTTCATGG	121
	<i>WNT2</i>	<b>CH101 WNT2(RT) Rev</b>	GTAGGACCCTGCCAAAAAGG	
NM_006037	<i>HDAC4</i>	<b>CH112 HDAC4(RT) Fw</b>	GATCCAGAGGCAGATCCTCA	187
	<i>HDAC4</i>	<b>CH113 HDAC4(RT) Rev</b>	CTTCTCCAGCTCCTGCTCCT	
NM_053056	<i>CCND1</i>	<b>CH114 CCND1(RT) Fw</b>	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG	198
	<i>CCND1</i>	<b>CH115 CCND1(RT) Rev</b>	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG	
BC112199	<i>ERBB4</i>	<b>CH116 ERBB4(RT) Fw</b>	CATGGGCAACCTGGAGATAA	176
	<i>ERBB4</i>	<b>CH117 ERBB4(RT) Rev</b>	CCAAGGCATATCGATCCTCA	
NM_153425	<i>TRADD</i>	<b>CH138 TRADD(RT) Fw</b>	CGCATACCTGTTTGTGGAGTC	159
	<i>TRADD</i>	<b>CH139 TRADD(RT) Rev</b>	ATCTTCAGCATCTGCAGCAC	
NM_003790	<i>TNFRSF25</i>	<b>CH140 TNFRSF25(RT) Fw</b>	CGTCCAGTTGGTGGGTAACA	201
	<i>TNFRSF25</i>	<b>CH141 TNFRSF25(RT) Rev</b>	TCCATCACGTCGTAGAGCTG	
BC013297	<i>CD7</i>	<b>CH154 CD7(RT) Fw</b>	GCGGTGATCTCCTTCCTCCT	168
	<i>CD7</i>	<b>CH155 CD7(RT) Rev</b>	GGTACTGGTTGGGGGAGGAC	
BC019270	<i>CDC42</i>	<b>CH158 CDC42(RT) Fw</b>	CAGACTCGGCTGGATCTGC	163
	<i>CDC42</i>	<b>CH159 CDC42(RT) Rev</b>	CCTGAGGTTACGGCCAAGTG	
NM_005806	<i>OLIG2</i>	<b>CH160 OLIG2(RT) Fw</b>	AGCTCCTCAAATCGCATCCA	121
	<i>OLIG2</i>	<b>CH161 OLIG2(RT) Rev</b>	GCCGGCAGAAAAAGGTCATC	
NM_014276	<i>RBPJL</i>	<b>CH164 RBPJL(RT) Fw</b>	CTCCCAATCCTTTGACTCACCT	250
	<i>RBPJL</i>	<b>CH165 RBPJL(RT) Rev</b>	CCCCGAGAGGTAGACACAGG	
NM_004764	<i>PIWIL1</i>	<b>CH166 PIWIL1(RT) Fw</b>	GGAATGGAGAGGATGTGAGGAT	200
	<i>PIWIL1</i>	<b>CH167 PIWIL1(RT) Rev</b>	AGTAGTGAAGCCAGGCCAAATC	
NM_003152	<i>STAT5A</i>	<b>CH168 STAT5A(RT) Fw</b>	TACTTGGCCCAGTGGATTGAG	200
	<i>STAT5A</i>	<b>CH169 STAT5A(RT) Rev</b>	ATTGTACAGAATGTGCCGGATG	
NM_000474	<i>TWIST1</i>	<b>CH170 TWIST1(RT) Fw</b>	GCCAGGTACATCGACTTCCTCT	150
	<i>TWIST1</i>	<b>CH171 TWIST1(RT) Rev</b>	TTCTCTGGAAACAATGACATCTAGG	
U66306	<i>RXRA</i>	<b>CH172 RXRA(RT) Fw</b>	ACAGCTGCATTCTCCCATCAG	170
	<i>RXRA</i>	<b>CH173 RXRA(RT) Rev</b>	CTGACGGGGTTCATAGGTGAG	
BC029364	<i>ICAM4</i>	<b>CH174 ICAM4(RT) Fw</b>	AGGATCACCGCTACAAACC	180
	<i>ICAM4</i>	<b>CH175 ICAM4(RT) Rev</b>	CAGCAGCAAACCTCGTAGGTCAA	
NM_170713	<i>RASSF1</i>	<b>CH183 RASSF1(RT) Fw</b>	CCCTGAGCTTTGTCCTGAAG	176
	<i>RASSF1</i>	<b>CH182 RASSF1(RT) Rev</b>	TTCTGGCGGCAATAGGAGTA	
NM_003507	<i>FZD7</i>	<b>CH188 FZD7(RT) Fw</b>	CCTCGTGCCTCCTCAG	180
	<i>FZD7</i>	<b>CH189 FZD7(RT) Rev</b>	CCCTTCTCTCCGTGGTACG	
NM_001261	<i>CDK9</i>	<b>CH190 CDK9(RT) Fw</b>	TGAAGAAGGTGCTGATGGAA	104
	<i>CDK9</i>	<b>CH191 CDK9(RT) Rev</b>	CAAGTTGACCACATTCTCGTG	
NM_004626	<i>WNT11</i>	<b>CH206 WNT11(RT) Fw</b>	TGAAGGACTCGGAACTCGTCT	111
	<i>WNT11</i>	<b>CH207 WNT11(RT) Rev</b>	CGTTGGATGTCTTGTGCACTG	
NM_053056	<i>CCND1</i>	<b>CH216 CCND1(RT) Fw</b>	GTGCTGCCAAGTGGAAACC	174
	<i>CCND1</i>	<b>CH217 CCND1(RT) Rev</b>	ATCCAGGTGGCGACGATCT	
NM_003395	<i>WNT9A</i>	<b>CH220 WNT9A(RT) Fw</b>	GTGGGCAAGCATCTGAAGC	183
	<i>WNT9A</i>	<b>CH221 WNT9A(RT) Rev</b>	GCAGAAGCTAGGCGAGTCA	
BC010507	<i>CD14</i>	<b>CH224 CD14(RT) Fw</b>	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	122
	<i>CD14</i>	<b>CH225 CD14(RT) Rev</b>	GCATGGATCTCCACCTCTACTG	
NM_057158	<i>DUSP4</i>	<b>CH226 DUSP4(RT) Fw</b>	TTCCTCCAACGGAAGCCAG	174
	<i>DUSP4</i>	<b>CH227 DUSP4(RT) Rev</b>	ACTCGGAGGAAAACCTCTCATA	
AK075419	<i>UBAC2</i>	<b>CH228 UBAC2(RT) Fw</b>	AACACACACTGATGAGAGTGC	105
	<i>UBAC2</i>	<b>CH229 UBAC2(RT) Rev</b>	CGCTAACACGCCAGGAAAA	

### 3.1.10 Aufreinigungs- und Amplifizierungsreagenzien

Name	Hersteller
PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Plus Kit	Qiagen
Whole Genome Amplification Kit	Sigma
Sybr® GreenER™ qPCR SuperMix	Invitrogen
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad

### 3.1.11 Geräte

Name	Hersteller
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystem
Centrifuge 5804R	Eppendorf
Realplex	Eppendorf
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Nanodrop
Elisareader MR5000	Dynatech

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Methoden

#### I. Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in RPMI-Medium unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin unter sterilen Bedingungen in einer H<sub>2</sub>O-gesättigten 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C, kultiviert. Alle drei bis vier Tage erfolgte die Passage im Verhältnis 1:4 bis 1:5.

Bei der verwendeten Linie K562 handelt es sich um immortalisierte, das Philadelphiachromosom tragende Zellen, die in der Phase der Blastenkrise aus Blut einer 53-jährigen CML-Patientin isoliert wurden [86]. Die Jurkat Zelllinie stellt immortalisierte T-Lymphoblasten dar, die aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit T-Zell-Leukämie gewonnen wurden [87]. Zellen der Linie KG1 sind Zellen einer akuten myeloischen Leukämie, die aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes gewonnen wurden [88] und HL60 Zellen wurden aus dem Blut einer 36-jährigen Frau mit akuter promyelozyten Leukämie gewonnen [89]. Erhältlich waren diese Zelllinien über die Deutsche Sammlung für Zellen und Mikroorganismen (DSMZ). Zur Bestimmung der in den Experimenten benötigten vitalen Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

## II. Isolation leukämischer Blasten

Um ERG Targetgene *in vivo* zu identifizieren, wurden leukämische Blasten aus dem Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie isoliert. Die 6 ausgewählten Patienten (5 AML, 1 T-ALL) hatten eine neu diagnostizierte akute Leukämie und wurden im Rahmen klinischer Studien behandelt. Die schriftliche Einverständniserklärung nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki wurde von allen Patienten unterzeichnet und ein positives Ethikvotum liegt für die Verwendung der Knochenmarkaspirate vor. Die Proben wurden aus einer Knochenmarkaspiration gewonnen und frisch mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die Zellen wurden sofort mit Formaldehyd fixiert (siehe ChIP-chip Protokoll), pelletiert und bei -80 °C gelagert.

Die Gruppe der Patienten war aus 3 Frauen und 3 Männern zusammengesetzt und das Alter der Patienten bei Probenentnahme lag zwischen 46 und 59 Jahren. Die relative ERG mRNA-Expression (im Vergleich zur Expression des *House Keeping Gens Glukosephosphat-Isomerase - GPI*) rangierte von 0,17 bis zu 1,23 (Tabelle 2).

**Tab. 2: Klassifizierung der primären Leukämieproben.** Dargestellt ist die Art der akuten Leukämie, Geschlecht, Alter bei Probenentnahme und die relative ERG-Expression (rE) gemessen mittels qrt-PCR.

Probenbezeichnung	Erkrankung	Geschlecht	Alter bei Probenentnahme in Jahren	ERG mRNA-Expression
AML A	AML	w	47	0,17 rE
AML B	AML	m	59	0,26 rE
AML C	AML	w	59	0,68 rE
AML D	AML	w	46	1,02 rE
AML E	AML	m	55	1,23 rE
T-ALL	T-ALL	m	52	0,38 rE

## III. Extraktion von Ribonukleinsäure

Die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach der *single Step* Methode. Mit einem speziellen Puffer werden die Zellen lysiert und Protein denaturiert. Anschließend erfolgt die Passage durch eine Silicagelmembran, an die die RNA gebunden wird. Zuletzt kann die RNA dann eluiert werden.

Zunächst wurde der Puffer frisch hergestellt, dazu wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Puffer gegeben. RLT-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, ein chaotropes Salz,

## Materialien und Methoden

das Proteine denaturiert und inaktiviert. Somit werden auch die im Zellysat befindlichen RNasen direkt nach Lyse der Zellen inaktiviert und man erhält qualitativ hochwertige RNA. Nach der Zellyse wurde die Probe zunächst in einer QIAshredder-Säule homogenisiert. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen hergestellt, so dass sich die gesamte RNA spezifisch an die Silicagel-Membran binden konnte, während andere Substanzen wie DNA und Proteine effizient ausgewaschen wurden. Nach mehreren Waschschritten wurde die genomische DNA entweder mit DNase-Verdau oder mit gDNA Eliminator Spin Column (RNeasy Mini Plus Kit) eliminiert. Schließlich wurde die reine RNA mit 30 µL Nuklease-freiem Wasser von der Säule eluiert und bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren.

### **IV. Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure**

Bei der Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde mit dem TRIzol Reagent<sup>®</sup> der Firma Invitrogen gearbeitet. Dieses Verfahren basiert auf der sogenannten *single Step* Methode nach Chomczynski und Sacchi [90]. Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen und andere Enzyme inaktiviert. Zusätzlich enthält das Reagenz Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgt die Phasentrennung. Danach sind drei Phasen zu erkennen. Die obere wässrige Phase enthält RNA, die Interphase DNA und die untere Phenolphase Proteine. Die RNA und DNA werden getrennt aufgereinigt. Die Zellen ( $1 \times 10^7$ ) wurden mittels Zentrifugation pelletiert und anschließend in 1 ml TRIzol Reagenz resuspendiert. Nun wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 15 Minuten bei  $10600\text{ min}^{-1}$  und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Phasen getrennt. Die rosafarbene DNA-Phase wurde mit 300 µl 100 %igem Ethanol versetzt und anschließend bei  $7000\text{ min}^{-1}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in mehreren Waschschritten mit 0,1M Natriumcitrat in 10 % Ethanol gereinigt und anschließend noch einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wird das Pellet unter dem Abzug getrocknet und kann in 80 – 300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert werden. Die genomische DNA wurde bei  $-20\text{ °C}$  bzw. bei häufigem Gebrauch bei  $4\text{ °C}$  gelagert.

## V. Herstellung von Proteinlysaten

Bei der Herstellung von Proteinlysaten für *Western Blot* wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml RIPA Puffer homogenisiert. Der Puffer lysiert Zell- und Kernmembran und setzt so die Proteine frei. Zur Vermeidung einer Denaturierung der Proteine wurde dem RIPA Puffer stets 200  $\mu$ l eines Protease Inhibitors frisch zugesetzt. Die Lagerung des Proteinlysats erfolgte bei  $-80$  °C.

## VI. Spektralphotometrische Quantifizierung der DNA und RNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA und RNA wurde im Spektralphotometer (Nanodrop) die Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dazu wurde die zu vermessende Nukleinsäurelösung gegen das reine Lösungsmittel gemessen. Die Konzentration wird von dem Programm automatisch berechnet. Bei doppelsträngiger DNA entspricht dabei eine optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$  nm) von 1 einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml DNA. Der Koeffizient  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  gibt die Reinheit an. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, sollte er größer als 1,8 sein.

Analog entsprechen 40  $\mu$ g RNA/mL einer optischen Dichte (OD) von 1. Das Verhältnis  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

## VII. Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bio-Rad Protein Assay

Die Proteinbestimmung nach dem Bio-Rad Protein Assay macht sich zu Nutze, dass das Absorptionsmaximum des Coomassie® Brilliant Blue G-250 Farbstoffes in Anwesenheit von Proteinen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Diese Änderung beruht auf der Bindung an basische und aromatische Aminosäureseitenketten, besonders Arginin.

Anhand der Intensität der Absorption bei 595 nm kann über eine Standardkurve die Proteinkonzentration ermittelt werden. Es wurden Proteinstandardlösungen mit einer Konzentration zwischen 0,05 mg/ml und 0,5 mg/ml angefertigt. Anschließend wurde die azidophile Färbelösung mit einem Whatman-Filterpapier filtriert, um alle Partikel, die die photometrische Messung stören würden, zu entfernen, und 1:5 verdünnt. Von den Proteinstandard- und Probenlösungen wurden jeweils 10  $\mu$ l mit 200  $\mu$ l verdünnter Färbelösung versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm und Bestimmung der Proteinkonzentration über eine Standardkurve.



### VIII. Synthese komplementärer DNA aus RNA

Für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wird die RNA Sequenz in eine DNA Sequenz umgeschrieben. Es wurden 500 ng RNA eingesetzt. Zum Umschreiben der gesamten mRNA einer Zelle wird als Primer ein Oligo-dT-Nukleotid, bestehend aus 20 Desoxythymidinen verwendet. Eine Reverse Transkriptase schreibt die RNA in cDNA um, baut anschließend die RNA ab und synthetisiert den komplementären DNA Strang. Damit ein vorzeitiger Abbau der RNA verhindert wird, enthält das Reaktionsgemisch einen RNase Inhibitor sowie einen Puffer für optimale Reaktionsbedingungen und dNTPs mit einer Endkonzentration von 1 mM.

	Konzentration	Volumen
AMV Reverse Transkriptase	220 U/l	0,5 µl
Oligo-dT-Nukleotid		2,0 µl
dNTP	10 mM	2,0 µl
5x Reaction Buffer		4,0 µl
RNase Inhibitor		0,5 µl
RNA	500 µg	11,0 µl
Gesamtvolumen		20,0 µl

Das Reaktionsgemisch wird für eine Stunde bei 55°C im Thermocycler inkubiert.

### 3.2.2 Polymerasekettenreaktion

#### I. Design von Oligonukleotid-Primern

Das Entwerfen der Primer (siehe vollständige Liste der Primersequenzen unter 3.1.10) wurde mittels des im Internet angebotenen Primer3-Programms durchgeführt (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Dabei wurden einige wichtige Prinzipien beachtet: Die Oligonukleotide sollten stets etwa 20 Basenpaare lang sein und einen Guanidin-/Cytosingehalt von 60 % aufweisen. Die Annealingtemperatur der Primer wurde auf 60°C festgelegt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 4 gleiche Nukleotide hintereinander auftraten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Die Primer sollten nicht untereinander hybridisieren können und die Sequenz musste spezifisch für den jeweiligen DNA-Abschnitt sein. Die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (Amplikon) betrug

## Materialien und Methoden

stets zwischen 150 und 250 Basenpaaren. Für die Promotorprimer und Primer für die cDNA (RT Primer) galten noch jeweils spezielle Regeln.

Beim Design der Promotorprimer wurde stets darauf geachtet, dass das Amplikon die hoch konservierte ETS Konsensussequenz (GGAA) beinhaltet um sicherzustellen, dass die ERG-bindende Region des Promotors für das Design der Primer gewählt wurde. Die verwendete Sequenz des Promotors entstammt der Transcriptional Regulatory Element Database (TRED) des Cold Spring Harbor Laboratory (<http://rulai.cshl.edu/>). Für die RT Primer war es wichtig, dass das Amplikon eines oder mehrere Introns überspannte, bzw. einer der Primer am Übergang von 2 Exons lag, um sicherzustellen, dass bei der PCR lediglich cDNA und nicht genomische DNA amplifiziert werden konnte.

### II. Überprüfen der Primerspezifität mittels PCR

Die Primerspezifität wurde mittels PCR getestet. Es wurden 200 ng DNA Matrize (genomische DNA bzw. komplementäre cDNA), ein Primergemisch, das Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit einer Endkonzentration von 300 nM enthielt sowie Desoxyribonukleotide und eine thermostabile DNA Polymerase, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, mit dem Puffer GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer (Applied Biosystem) eingesetzt.

	Name	Hersteller	Konzentration	Volumen
DNA-Matrize			100 ng/µl	2 µl
Thermostabile DNA-Polymerase	AmpliAq Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystem	5 U/µl	0,25 µl
Desoxyribonukleotide			10 mM	0,75 µl
PCR-Puffer	GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer	Applied Biosystem		2,5 µl
Primer			10 µM	0,75 µl
Wasser (bidest.)				18,75 µl
Endvolumen				25 µl

Daraufhin wurde im Thermocycler inkubiert, zunächst 10 Minuten bei 95°C zum Aktivieren der DNA-Polymerase. Anschließend erfolgten 35 Zyklen des folgenden Programms: Bei 95°C wird die DNA für 15 Sekunden denaturiert, so dass sie in beide Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Bei 60°C erfolgt für 15 Sekunden das Hybridisieren der Primer (Annealing) und schließlich bei 72°C für 30 Sekunden die Elongation, während der die DNA-Polymerase die komplementären Desoxyribonukleotide an den

## Materialien und Methoden

wachsenden DNA-Strang anfügt. Es wurden 35 Zyklen dieses Programms durchgeführt, um eine ausreichende Menge der gewünschten DNA zu erhalten.

Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
95	10 min	
95	15 s	35
60	15 s	35
72	30 s	35

Zum Schluss wurde das PCR-Produkt mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

### III. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA im Gel erfolgt entsprechend ihrer Größe. Es wurden 1,5 %ige Agarosegele mit einem Ethidiumbromidzusatz von 10 µl/100 ml TAE Puffer verwendet (Konzentration des Ethidiumbromids 1 mg/ml). Die Proben wurden vor dem Lauf mit Laufpuffer versetzt. Nach dem Auftragen der Proben und des Größenstandards wurde die Auftrennung bei 90 V/cm gestartet. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Bromphenolblaufront  $\frac{2}{3}$  des Gels passiert hatte. Mit UV-Licht von 312 nm wurden die DNA-Banden visualisiert und fotografisch dokumentiert.

### IV. Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem PCR Purification Kit

Für die anschließenden qrt-PCR Versuche und Array-Hybridisierungen ist eine hohe Reinheit der DNA notwendig, um Artefakte zu vermeiden. Deshalb ist eine Aufreinigung der PCR-Produkte notwendig um überschüssige Salze, Nukleotide und Enzyme zu entfernen. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Das PCR-Produkt wurde, wie im Protokoll beschrieben, mit dem 5-fachen Volumen an Binding Puffer versetzt. Dieser Puffer enthält ein chaotropes Salz sowie Guanidinhydrochlorid. Diese sorgen für den richtigen pH-Wert und Reaktionsbedingungen, damit die DNA fest an die Silicagelmembran binden kann. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit ethanolhaltigem Waschpuffer zum Entfernen der nach der PCR noch vorhandenen Nukleotide, Enzyme und Salze. Die Elution von der Membran wurde mit 30-50 µL Wasser durchgeführt. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.

## V. Quantitative real-time PCR

Die qrt-PCR wurde mit dem Mastercycler® ep realplex System (Eppendorf) durchgeführt. Verwendet wurde der SYBR GreenER™ qPCR SuperMix for ABI PRISM® (Invitrogen). Die qrt-PCR ist eine einfache Möglichkeit zur Quantifizierung von DNA-Produkten während der Amplifikation. Verwendet werden Fluoreszenzfarbstoffe, die mit doppelsträngiger DNA interkalieren. Der verwendete Sybr Green Farbstoff ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff, der nach Bindung an doppelsträngige DNA einen DNA-Farbstoff-Komplex bildet, welcher blaues Licht von 494 nm Wellenlänge absorbiert und grünes Licht von 521 nm Wellenlänge emittiert. Die Intensität der grünen Fluoreszenz korreliert dabei linear mit der Menge an gebildeter doppelsträngiger DNA. Zur Quantifizierung wird der C<sub>T</sub>-Wert (cycle treshhold) herangezogen. Dieser entspricht dem Zyklusschwellenwert, bei dem die Amplifikation das erste Mal in eine exponentielle Phase eintritt, d. h., dem Zyklus, der zum ersten Mal in einer Verdopplung der DNA Menge resultiert. Dabei gilt, je größer die eingesetzte Ausgangsmenge an DNA, desto früher beginnt die exponentielle Phase der Amplifikation.

In unseren Versuchen wurden 200 ng DNA-Matrize bzw. 2 µl cDNA eingesetzt sowie 12,5 µl Sybr Green Reaktionsgemisch, ROX™ Passive Reference Dye mit einer Endkonzentration von 5nM und das Primergemisch mit einer Endkonzentration von 200 nM.

Sybr Green Mastermix (Invitrogen)	DNA- Matrize	Primergemisch 10 µM	Rox Reference Dye 500 nM (Invitrogen)	H <sub>2</sub> O
12,5 µl	6,75 µl	0,5 µl	0,25 µl	5 µl

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation im Thermocycler:

Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
50	2 min	
95	10 min	
95	15 s	40
55	15 s	40
72	30 s	40

Zum Schluss erfolgte noch eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird das PCR-Produkt langsam von 60°C auf 95°C erhitzt. Die Temperatur, bei der die DNA in ihre

## Materialien und Methoden

Einzelstränge aufgeschmolzen wird, ist durch einen plötzlichen Abfall der Fluoreszenzintensität gekennzeichnet, der registriert wird. Diese Schmelzkurvenanalyse dient dem Ausschluss von unspezifischen PCR-Produkten, wie z.B. Primerdimeren, die bei einer niedrigeren Temperatur bereits in ihre Einzelstränge zerfallen und damit vom PCR-Produkt abgegrenzt werden können.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel und die verwendete Formel für die Anreicherung lautet:  $A = 2^{(CT_{Kontrolle} - CT_{Probe})}$ .

### 3.2.3 Chromatin-Immunopräzipitation on chip

#### I. Chromatin-Immunopräzipitation

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Chromatin-Immunopräzipitation on chip, ERG-regulierte Targetgene zu identifizieren und zu validieren. Aus diesem Grund sind 7 ChIP-chip Versuche durchgeführt worden (Tabelle 3). Ein ChIP-chip Versuch an der T-ALL Zelllinie Jurkat ist in Vorversuchen zu dieser Arbeit durchgeführt worden, allerdings erfolgte die Validierung der Targetgene und die bioinformatische Auswertung im Rahmen dieser Arbeit. Die Hybridisierung der Jurkatprobe erfolgte durch die Firma NimbleGen und die statistische Auswertung mittels *Sliding Window Analyse*. Die 6 primären Leukämieproben (5 AML, 1 T-ALL) sowie die Negativkontrolle in Form der Zelllinie HL60 wurden in Kooperation mit Prof. Müller-Tidow des Universitätsklinikums Münster hybridisiert und mittels *class comparison* ausgewertet. Anschließend wurden alle Proben einer bioinformatischen Auswertung mittels DAVID bioinformatic resources und Ingenuity Pathway Analysis (IPA) unterzogen.

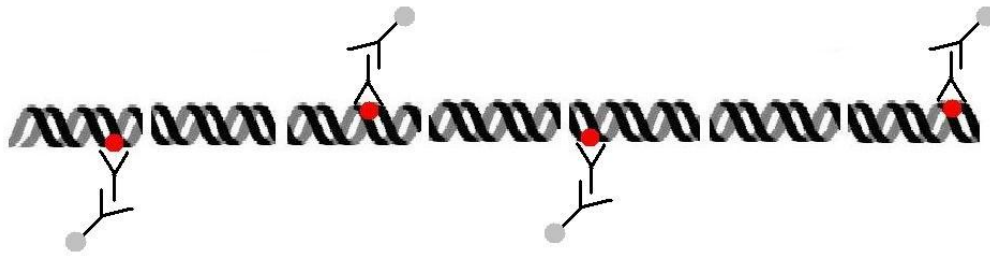
**Tab. 3: Schema der ChIP-chip Versuche an den Zelllinien Jurkat und HL60 sowie den primären Leukämieproben.**

	Ansätze der Chromatin-Immunopräzipitation	Hybridisierung	Statistische Auswertung	Bioinformatik
Zelllinie Jurkat	1x Input 1x IgG 1x ERG C-20 1x ERG C-17/C-20	NimbleGen	Sliding Window Analyse	Anreicherung von Funktionen und
Primäre Leukämieproben (5 AML, 1 T-ALL) Zelllinie HL60	2x Input 2x IgG 2x ERG C-20	AG Müller-Tidow (Universitätsklinikum Münster)	Class Comparison	Signalwegen (DAVID, IPA)

## Materialien und Methoden

Um ein ChIP-chip Experiment durchführen zu können, braucht man etwa  $10^7$  bis  $10^9$  Zellen. Kultivierte Zellen wurden mittels Zentrifugation ( $900 \text{ min}^{-1}$ , 8 min,  $4^\circ\text{C}$ ) isoliert und in 40 ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte das Fixieren (Cross linking) mit 37% Formaldehyd bei einer Endkonzentration von 1%. Das Behandeln mit Formaldehyd bewirkt, dass die an die Promotoren gebundenen TF mit den entsprechenden DNA-Abschnitten assoziiert bleiben. Formaldehyd knüpft eine feste Verbindung zwischen Lysinseitenketten der Proteine und den DNA-Basen [84]. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Formaldehyd mit 2,5 M Glycin (Endkonzentration 0,125 M) neutralisiert. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen dem Fixieren von  $1 \times 10^9$  Zellen. Bei geringerer Zellzahl wurde entsprechend weniger Formaldehyd und Glycin verwendet. Eine zu geringe Formaldehydkonzentration hat eine unvollständige Fixation zur Folge und eine zu hohe Konzentration kann Epitope maskieren [83]. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in kaltem RIPA Puffer lysiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen sonifiziert. Der Sonicator lysiert die Zellen und Nuclei durch Ultraschall und fragmentiert gleichzeitig die DNA. Je nach Dauer und Intensität erhält man unterschiedlich große DNA-Bruchstücke, wobei meist eine mittlere Fragmentlänge von etwa 500 bis 1000 Basenpaaren angestrebt wird [84]. Der Erfolg der Fragmentierung kann durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Die Fragmentierung ist notwendig, da zu lange Fragmente eine unspezifische bzw. ineffektive Präzipitation zur Folge haben [83]. Zu kurze Fragmente erhöhen allerdings die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen bei der Hybridisierung. Das Zelllysate wurde mittels Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der Agarosekügelchen hinzugegeben und das Lysat 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  rotiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß übernommen und das Präzipitat verworfen. Durch dieses Vorreinigungsverfahren sollen unspezifische Bindungen vor der ChIP entfernt werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Biorad Protein-Assay, s.o.) wurden 0,5 mg Protein-/DNA-Lysat für jede Versuchsgruppe und die IgG-Kontrolle eingesetzt. Für die Input-Kontrolle waren es 0,1 mg Lysat. Es wurden 3  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Antikörpers (ERG C20 und IgG) hinzugegeben und bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht rotiert. Die Inputkontrolle wurde ohne Antikörperaddition mitgeführt. Am nächsten Morgen wurden 40  $\mu\text{l}$  Agarosekügelchen hinzugegeben und noch einmal 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  auf dem Rotor inkubiert. Während dieser Zeit haben die IgG-gebundenen Agarosekügelchen an die bereits auf

der DNA befindlichen Antikörper gebunden und konnten so durch Zentrifugation die gebundenen DNA-Abschnitte präzipitieren (Abbildung.3).



**Abb. 3 Immunopräzipitation.** Der TF wird durch einen oder mehrere spezifische Antikörper, die mit Agarosekugeln markiert sind, gefällt.

Dann erfolgten die Waschschrirte. Mit jedem Puffer (Salzpuffer 1, Salzpuffer 2, LiCl-Puffer und TE-Puffer) wurde zwei Minuten gewaschen, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Antikörper mittels zweimaliger 15-minütiger Elution in Elutionspuffer vom Protein gelöst.

Zum eluierten Überstand wurden 8 µl einer 5 M NaCl Lösung (Endkonzentration 200 mM) gegeben, um die Protein-DNA-Bindung zu lösen (Reverse-Cross-linking) sowie 1 µl RNase A und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 4 µl EDTA (0,5 M), 4 µl TRIS (pH 6,5) und Proteinase K (Endkonzentration 100 µg) hinzugegeben und 1 h bei 42 °C inkubiert um die Proteine zu denaturieren. Schließlich erfolgte eine Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit.

Da das gereinigte Lysat eine sehr geringe DNA-Menge aufweist, ist eine Amplifikation der Fragmente notwendig. Diese muss unspezifisch erfolgen, da alle Fragmente nach der Amplifikation in den gleichen Verhältnissen vorhanden sein sollen wie vor dieser.

## II. DNA-Amplifikation mit dem Whole Genome Amplifikation Kit

Die Amplifikation des gereinigten DNA-Produkts erfolgte mit dem Whole Genome Amplifikation Kit (WGA - Sigma). Es wurden 10 µl des gereinigten DNA-Lysats eingesetzt und 2 µl des Library Preparation Buffers sowie 1 µl der Library Stabilization Solution hinzugegeben. Nach 2-minütiger Inkubation bei 95 °C und anschließender Kühlung auf Eis wurde 1 µl des Library Preparation Enzym hinzugegeben und bei folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

## Materialien und Methoden

Temperatur in °C	Dauer in Minuten
16	20
24	20
37	20
75	5

Anschließend wurden 7,5 µl Amplification Master Mix, 47,5 µl nukleasefreies Wasser und 5 µl WGA DNA Polymerase hinzugegeben und im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

Temperatur in °C	Dauer
95	3 Minuten
95	15 Sekunden/ 14 Zyklen
65	5 Minuten/ 14 Zyklen

Im Anschluss daran erfolgte noch eine Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen).

### III. ChIP-chip Versuche an der Zelllinie Jurkat

Die aus Juraktzellen gewonnenen DNA-Lysate wurden mit zwei ERG-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Antikörper ERG C17 und C20 erkennen unterschiedliche Epitope des ERG-Proteins. In der Versuchgruppe 1 wurde nur der C20 Antikörper verwendet und in der Versuchgruppe 2 ein äquimolares Gemisch aus beiden Antikörpern C17 und C20 um die Effizienz der Präzipitation zu erhöhen. Jede Versuchsgruppe wurde mit Cy5-Fluoreszenz markiert und gegen jeweils Inputkontrolle und IgG-Kontrolle (beide jeweils Cy3-markiert) hybridisiert.

Die Hybridisierung der Proben aus dem Versuch an Jurkatzellen erfolgte auf ein Promotorarray von NimbleGen (385K RefSeq Promoters). Normalisierung und statistische Auswertung wurde durch Dr. Neumann (Institut für Biometrie und Epidemiologie, Charité, Campus Mitte) durchgeführt. Die Normalisierung der statistischen Daten erfolgte nach dem Lowess-Prinzip. Für die statistische Auswertung wurde die *sliding-window* Methode (Fenstergröße von 2000 bp) angewandt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die präzipitierten Fragmente größer sind als die auf dem Array befindlichen Oligos, so dass stets über einen Bereich von 1000 bis 2000 bp um die Transkriptionsfaktorbindungsstelle Anreicherungen auftreten. Anschließend wird



## Materialien und Methoden

stets für einen bestimmten Bereich des Arrays (window) der  $\log_2$  aus dem Quotient aller Punkte in diesem Fenster gebildet. Nun wird das Fenster um eine bestimmte Anzahl Basenpaare verschoben und erneut der  $\log_2$  des Quotienten aller Punkte gebildet. So wird weiter verfahren. Da statistisch gesehen mit zunehmender Entfernung von der Transkriptionsfaktorbindungsstelle die Anzahl der Fragmente abnimmt, erhält man mit dieser Methode ein Maximum (peak) für die  $\log_2$  Quotienten an der mutmaßlichen Bindungsstelle.

Als mutmaßliche Targetgene wurden jene Gene angesehen, die in beiden Versuchsgruppen (C20 bzw. C17/ C20) gegen entweder die Input- oder die IgG-Kontrolle angereichert waren. Die p-Werte wurden durch Benjamini-Hochberg-Gleichung korrigiert und der Schwellenwert bei  $p < 0,1$  angesetzt.

### **IV. ChIP-chip an primären Leukämieproben**

Die ChIP-chip Versuche an primären Leukämieproben erfolgten in Kooperation mit Prof. Müller-Tidow, Universitätsklinikum Münster.

#### **DNA-Fluoreszenzmarkierung**

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit aminoallyl dUTP konjugiert. Verwendet wurde das BioPrime<sup>®</sup> DNA Labeling System (Invitrogen, Carlsbad, CA). Die Aminogruppen der Aminoallylverbindungen sind aliphatisch und daher reaktionsfreudiger als die Aminogruppen der Nukleotidringe. Deshalb fungieren sie als Reaktionspartner für die anschließende Konjugation mit dem monofunktionalen N-Hydroxisuccinimid (NHS) Ester der Alexa Farbstoffe. Alexa Fluor sind Fluoreszenzfarbstoffe, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer anderen Wellenlänge emittieren, so dass sie detektiert werden können. Die Nummerierung entspricht grob ihrem Absorptionsmaximum. Es wurde Alexa Fluor 647 (rot) für die Input-Kontrolle und Alexa Fluor 555 (gelb-grün) für die Versuchsgruppen (ERG-C20 oder IgG) verwendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die aminoallyl-dUTP Konjugation verwendet:

## Materialien und Methoden

Name	Hersteller	Konzentration	Volumen
DNA		1 µg/45 µl	45 µl
2.5X Random Primers Solution	Invitrogen	2,5x	40 µl
10X dNTP Mix	Invitrogen	2mM dATP 2mM dCTP 2mM dGTP 0.35mM dTTP	10 µl
aminoallyl-dUTP	Sigma	10 mM	2,5 µl
Klenow Fragment Polymerase	Invitrogen	40 U/µl	2,5 µl

Nach Zugabe der Primer wurde der Reaktionsansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend ist der Mastermix hinzugegeben worden und die Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung erfolgte bei 37 °C für 1 h. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl eines Stoppuffers (Invitrogen) beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mittels des PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Konjugation der Farbstoffe. Die DNA wurde mittels Vakuumzentrifugation (Speed Vac) komplett getrocknet und anschließend in 5 µl Wasser und 3 µl NaHCO<sub>3</sub> resuspendiert. Es wurde das Alexa Fluor® 555 and Alexa Fluor® 647 reactive dye decapacks (Invitrogen) verwendet. Die Farbstoffe wurden in DMSO gelöst und jeweils 2 µl zu den 8 µl DNA hinzugegeben. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Rüttler inkubiert. Nun wurden 35 µl 100 mM NaAcetat (pH 5,2) und 56 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben und das Reaktionsgemisch mittels PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Es erfolgte wiederum eine Trocknung im Speed Vac.

### Hybridisierung auf das Promotorarray

Das Promotorarray enthält mehr als 11.000 humane Gene sowie 500 Kontrolloligonukleotide. Das Design der Arrays ist unter <http://bioinformatics.skcc.org/array> beschrieben. Jeder humane Promotor wird durch zwei *upstream* gelegene und ein *downstream* gelegenes Oligonukleotid repräsentiert. Input- und amplifiziertes ChIP-Material wurden unterschiedlich farbmarkiert und auf ein Array hybridisiert. Für jede Patientenprobe wurden 4 Hybridisierungen durchgeführt, jeweils 2 für die ERG-Antikörper (C20-1 und C20-2) und 2 für die IgG-Kontrollen (IgG-1 und IgG-2). Für die Versuche an den primären Leukämieproben wurde lediglich der ERG C20 Antikörper und nicht mehr ERG C17 verwendet, da dieser im Jurkat ChIP-chip keine zusätzliche Verbesserung der Anreicherung von Targetgenen bewirkte und im *Western Blot* eine geringfügig niedrigere Effizienz der Immunopräzipitation zeigte.

## Materialien und Methoden

Die Hybridisierung der Proben erfolgte stets gegen die Input-Kontrolle. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die Arrays wurden nacheinander mit den Waschpuffern 1, 2 und 3 gewaschen und anschließend für 15 min bei 50 °C mit der Blocklösung inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu minimieren.

Die getrockneten und farbmarkierten DNA-Proben wurden in 4 µl human Cot-1 DNA® (Invitrogen) resuspendiert. Diese DNA-Lösung enthält repetitive Nukleotidsequenzen und verhindert Crosshybridisierung zwischen den repetitiven Sequenzen der DNA-Fragmente, indem es diese bindet. Die miteinander zu hybridisierenden DNA-Proben wurden nun gemischt und es wurden 52 µl Hybridisierungspuffer und Formamid hinzugegeben. Nun wurde die Lösung vorsichtig zwischen zwei Arrayplatten pipettiert und bei 38 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am folgenden Morgen erfolgte das Waschen der Arrays. Dazu wurde je zweimal mit den Postwaschpuffern 1 und 2 und einmal mit dem Postwaschpuffer 3 in einem 50 ml Falcontube gewaschen und anschließend bei 12000 /min für 3 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurden die Arrays im Array Scanner (Molecular Devices) gescannt.

### **Statistische Auswertung der Hybridisierungsdaten**

Nach dem Scannen der Microarrays erfolgte die statistische Auswertung. Es wurde die Spotreader Software (Niles Scientific, Portola Valley, CA) verwendet um jene Bereiche des Arrays zu markieren, die Fluoreszenzintensitäten unterhalb des festgelegten Schwellenwertes bzw. abnorme Morphologien aufwiesen, wie sie z.B. durch winzige Kratzer und Staubpartikel auf dem Array entstehen können. Die so markierten Bereiche wurden für die anschließende statistische Auswertung ausgeschlossen. Die Normalisierung der Daten erfolgte nach dem Prinzip der Medianzentrierung. An jedem Punkt des Arrays wurde der Zweierlogarithmus des Quotienten ( $\log_2$  ratio) aus beiden Fluoreszenzintensitäten gebildet [ $\log_2(\text{grün/rot})$  also  $\log_2(\text{ChIP/Input})$ ]. Anschließend wurde der Median dieser Werte von dem Wert der  $\log_2$  ratio an jedem Punkt abgezogen. Mittels BRB Array Tools Software wurde ein Klassenvergleich (engl. class comparison) zwischen den IgG Gruppen und der ERG-C20 Gruppe durchgeführt. Jede Gruppe besteht aus 2 unabhängigen Experimenten, da es 2 Hybridisierungen für jeden Antikörper gab. Es wurde ein F-Test zwischen den beiden Klassen durchgeführt um jene Gene zu identifizieren, die signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten in der ERG-C20 Klasse aufwiesen und somit mutmaßliche Targetgene des TFs ERG darstellen.

Targetgene wurden nach dem *fold change* (Ergebnis der  $\log_2$  ratio) mit einem P-Wert  $< 0,05$  sortiert.

### V. Bioinformatische Analyse der CHIP-chip Daten

Die Genlisten wurden auf eine Anreicherung des für ETS-TF spezifischen Bindungsmotivs GGAA/T hin untersucht. Die hierfür verwendete Software Pscan ist im Internet unter <http://159.149.109.9/pscan/> frei zugänglich. Die Listen der Gensymbole wurden zunächst in die RefSeq mRNA Bezeichnung mittels DAVID bioinformatic resources [91, 92] umgewandelt und anschließend in die Pscan Software hochgeladen und analysiert.

Für die bioinformatische Auswertung der mittels CHIP-chip gewonnenen Genlisten wurde ebenfalls die Software DAVID bioinformatic resources verwendet bzw. die Ingenuity Pathway Analysis Software. Die *Gene Bank Accession Numbers* wurden bei der Analyse eingesetzt und die Genlisten mit einem Anreicherungsfaktor von mindestens 1,25 gegenüber IgG und einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  verwendet. Von besonderem Interesse waren die Ergebnisse der Signalwege (Pathways – KEGG Datenbank) und von Genfunktionen (GOTERM\_BP\_1). Für eine signifikante Anreicherung wurde ein P-Wert  $< 0,05$  vorausgesetzt. Des Weiteren wurde der Benjamini-Hochberg P-Wert mit einbezogen, um für multiples Testen (multiple test correction) zu korrigieren. Die erhaltenen Listen wurden untereinander verglichen und reproduzierbare Ergebnisse vermerkt. Als Voraussetzung musste ein Signalweg oder eine Funktion in mindestens 3 der 6 primären Leukämieproben angereichert gewesen sein.

### 3.2.4 Zellkulturmethoden

#### I. Transfektion mit small-interfering RNA

Die Zelllinie KG1 weist eine ausreichende *ERG* mRNA-Expression auf (0,47), um einen effizienten *knock down* der mRNA zu gewährleisten. Die KG1 Zellen wurden nach dem Amaxa Protokoll (Lonza, Köln, Deutschland) mit *ERG*-spezifischer siRNA (sih5ERG) und siLuciferase transfiziert. Beide siRNAs wurden freundlicherweise durch die Firma Silence Therapeutics (Berlin Buch, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert, bevor die RNA isoliert wurde.

## II. Transfektion von K562 Zellen mit einem induzierbaren Vektorkonstrukt (Tet-on System)

Um die Veränderungen in Genexpressionsmustern, Proliferation und Therapieresistenz in Abhängigkeit von der *ERG*-Expression zu überprüfen, wurden Zellen der Linie K562, die keine *ERG*-Expression zeigt, mit einem induzierbaren Vektorkonstrukt transfiziert. Die cDNA der *ERG* Isoform 3 wurde mit spezifischen Primern [47] durch reverse Transkription synthetisiert. Ein kommerziell erhältliches System bestehend aus 2 Plasmiden, wurde verwendet (Clontech, Mountain View, CA, USA). Der Vektor pTet-onAdvanced (pTet) exprimiert ein Transaktivatorprotein (rTTA), welches in Gegenwart eines Tetracyclins, z.B. Doxycyclin (Dox), aktiviert wird. Die *ERG* mRNA wurde in einen zweiten Vektor kloniert, pTRE-Tight-BI-DsRed-Express (pTRE), der einen bidirektionalen Promotor mit Bindungstellen für rTTA aufweist. Durch diesen Promotor wird das transfizierte Gen sowie ein Fluoreszenzgen reguliert. Die Vektoren wurden nacheinander in K562 mittels Elektroporation eingebracht. Als Selektionsdruck wuchsen die Zellen stets unter Zugabe von Puromycin (1,25 µg/ml) und G418 (800 ng/ml), gegenüber welchen die transfizierten Zellen eine Resistenz aufwiesen. Die Zellen wurden als heterogene Population verschiedener Klone (bulk) ausgesät und durch Verdünnung Kolonien einzelner Klone gezüchtet. Die Induktion der *ERG*-Expression erfolgte durch tägliche Zugabe von 1 mg/ml Dox. Gemessen wurde die *ERG*-Expression nach RNA-Isolation und Umschreiben in cDNA durch Rotorgen Multiplex qrt-PCR. Die Biosynthese von des ERG-Proteins wurde mittels *Western Blot* bestätigt.

## III. Zellviabilitätsmessung

Um die Reduktion der Zellviabilität unter einer zytotoxischen Therapie zu messen, wurde der WST-1 Assay verwendet. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Reduktase System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene Disulphonat) in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag wurde in einem Spektralphotometer (ELISA Reader) bei 450 nm photometrisch gemessen. Eine verminderte Zellviabilität geht mit einer Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenasen einher, die den oben genannten Farbumschlag bewirken. Die Menge des gebildeten Formazans und damit das Ausmaß der photometrisch bestimmten Extinktion (bei einer Wellenlänge von 450nm) ist proportional zu der Anzahl der viablen Zellen.

## Materialien und Methoden

Zur Durchführung der Zellviabilitätsmessung wurden die Zellen zunächst auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml Zellkulturmedium (ZKM) für K562 und  $2,5 \times 10^5$  für die transfizierten Klone eingestellt. Jeweils 100  $\mu$ l der Zellsuspension, entsprechend einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  bzw.  $2,5 \times 10^4$ , wurden in Well 2-11 der Reihen B-G einer 96 Well Platte pipettiert, wobei dem ZKM der Spalten 7-11 noch Dox in einer Konzentration von 1  $\mu$ l/ml hinzugesetzt worden ist. Die Spalten 1 und 12 enthielten lediglich 200  $\mu$ l ZKM und die verwendeten Substanzen in den unterschiedlichen Konzentrationen (Hintergrundmessung). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit den Zytostatika und Kinaseinhibitoren in 90  $\mu$ l ZKM behandelt. Folgende Substanzen wurden verwendet: Cytosinarabinosid, BIO, BAY 43-9006 (Sorafenib), SL327, U0126, SP600125, SB203580, PD98059. Es erfolgten jeweils Fünffachbestimmungen. Die Inkubation über 24, 48 und 72 Stunden erfolgte bei 37 °C, einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 24 und 48 wurde zu jedem Well 10  $\mu$ l ZKM hinzugegeben, wobei die mit Dox induzierten Zellen ZKM mit einer Konzentration von 20  $\mu$ l Dox/ ml erhielten.

In die Wells der zu entwickelnden Platte wurde jeweils 20  $\mu$ l des 1:1 mit ZKM verdünnten WST-1-Reagenz pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über eine Stunde. Während dieser Zeit fand die Umsetzung des schwach rot gefärbten Substrats in das dunkelrote Formazan statt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die photometrische Messung im ELISA Reader. Das Gerät misst die Extinktion durch die Suspension bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Spalte/ Reihe	1	2-6	7-11	12
	nur ZKM	Zellen in ZKM	Zellen in ZKM mit Dox	nur ZKM mit Dox
A	leer	leer	leer	leer
B	leer	C <sub>0</sub>	C <sub>0</sub>	leer
C	leer	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	leer
D	leer	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	leer
E	leer	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	leer
F	leer	C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	leer
G	leer	C <sub>5</sub>	C <sub>5</sub>	leer
H	leer	leer	leer	leer

### 3.2.5 Proteinanalyse

#### I. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Auftrennen des Proteinlysats

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zum Auftrennen von Proteinmischungen. Man macht sich zu nutze, dass Proteine bei basischem pH negativ geladen sind und somit zur Anode wandern. Dabei werden sie entsprechend ihrer Größe mehr oder weniger durch die netzartige Struktur des Acrylamid-Gels zurückgehalten. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) im Gel bildet hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten und zerstört so die Tertiärstruktur eines Proteins. Jede Aminosäure reagiert mit zwei Molekülen SDS, die so die Eigenladung des Proteins überdecken. Das DTT im Probenpuffer sorgt außerdem noch für eine Reduktion der Disulfidbrücken, so dass auch die Quartärstruktur der Proteine zerstört wird, weil diese in ihre Untereinheiten zerfallen. Damit werden die Proteine allein nach Molekulargewicht aufgetrennt. Jedes Gel besteht aus einem Trenngel und einem darauf befindlichen Sammelgel.

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt (4 Anteile Proteinlysats: 1 Anteil Probenpuffer) und 5 Minuten bei 95°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren und die Quartär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Anschließend wurden 50 µl Proteinlysats in die Geltaschen gegeben. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 70 V, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Dann konnte die Auftrennung bei 110 V durchgeführt werden, bis die Lauffront das Ende des Sammelgels erreichte.

#### II. Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Nassblotverfahren (Biorad-Kammern) auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) transferiert. Die Membran wurde für 30 Sekunden mit Methanol aktiviert und anschließend mit Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde auf die PVDF-Membran gebettet, die anodenwärtig ausgerichtet war. Auf beiden Seiten wurde die Membran mit Gel-Blotting Papier (Whatman-Paper) bedeckt und kathodenwärtig zusätzlich mit Schaumstoff. Der Transfer erfolgte über Nacht in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei 0,15 A. Am folgenden Morgen wurde die Membran zunächst mit TBST-Puffer gewaschen und mit 3 % BSA in TBST-Puffer geblockt um unspezifische Bindungsstellen zu minimieren. Anschließend wurde für 3 h mit dem 1. Antikörper inkubiert und gründlich mit TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte für 45 Minuten und

## Materialien und Methoden

anschließender Waschung mit TBST-Puffer. Der gebundene Sekundärantikörper wird mit Hilfe des *enhanced chemoluminescence* (ECL)- Systems von Lumi- Light Plus<sup>R</sup> von Roche über die Chemilumineszenz des durch die Peroxidase umgesetzten Substrats und die damit verbundene Schwärzung vom Röntgenfilm detektiert.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der ChIP-chip Versuche

Das Ziel dieser Promotion war die Identifizierung von Targetgenen des TF ERG und Signalwegen, die durch diesen reguliert werden. Daher wurde ein genomweites Screening in Form von ChIP-chip Versuchen an 8 Proben durchgeführt. In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde das Chromatin-Immunopräzipitat der Jurkatzelllinie auf das *385K RefSeq Promotor Array* der Firma NimbleGen hybridisiert und mittels *Sliding Window Analyse* statistisch ausgewertet.

Zusätzlich wurden die primären Leukämieproben (AML A – E und T-ALL) und das Lysat der HL60 Zelllinie, die keine *ERG*-Expression aufweist und als Negativkontrolle fungiert, auf ein spezielles Promotorarray hybridisiert. Die ERG angereicherten Chromatinlysate und IgG-Lysate wurden gegen die Inputkontrollen aufgetragen und anschließend mittels eines Klassenvergleichs signifikant angereicherte Gene ermittelt (Tabelle 4).

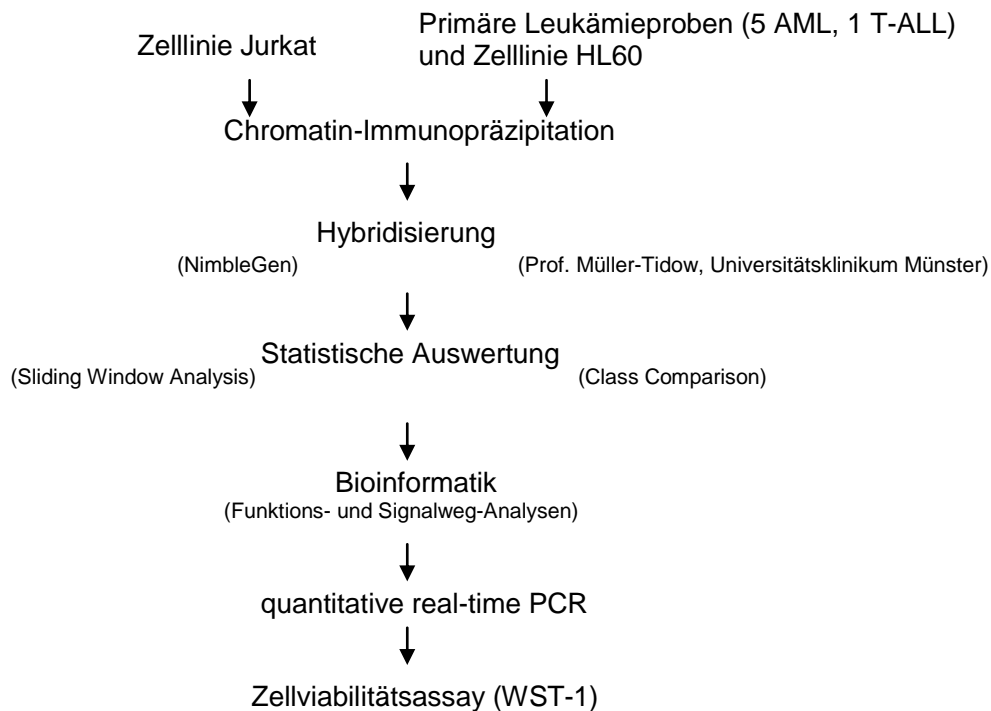
**Tab. 4: Schematische Darstellung der Hybridisierungen.** Für jede primäre Leukämieprobe und die HL60 Zellen wurden 4 Hybridisierungen durchgeführt, jeweils Input-1 gegen IgG-1 und Input-2 gegen IgG-2 sowie analog für die ERG-Proben Input-1 gegen ERG-1 und Input-2 gegen ERG-2. Durch diese Hybridisierungen wurden 4 Listen angereicherter Gene akquiriert, von denen die IgG-Listen als unspezifische Gene bzw. falsch positive Resultate behandelt wurden und die ERG-Listen als spezifisch ERG angereicherte Gene. Beide Genlisten wurden einem Klassenvergleich unterzogen, um jene Gene zu identifizieren, die lediglich in der ERG-Gruppe angereichert waren.

Hybridisierung #	Hybridisierte Proben	Fusion der Genlisten
Hybridisierung 1	Input-1 (Alexa 647 – rot) IgG-1 (Alexa 555 – gelb-grün)	unspezifische Gene
Hybridisierung 2	Input-2 (Alexa 647 – rot) IgG-2 (Alexa 555 – gelb-grün)	
Hybridisierung 3	Input-1 (Alexa 647 – rot) ERG-1 (Alexa 555 – gelb-grün)	ERG angereicherte Gene
Hybridisierung 4	Input-2 (Alexa 647 – rot) ERG-2 (Alexa 555 – gelb-grün)	

Die angereicherten Genlisten der Zelllinien (Jurkat und HL60) und primären Leukämieproben wurden einer bioinformatischen Analyse unterzogen, um signifikant

## Ergebnisse

angereicherte Funktionen und Signalwege zu ermitteln. Anschließend erfolgte die Validierung ausgewählter Targetgene mittels qrt-PCR und schließlich sollte die Wirksamkeit ausgewählter Inhibitoren auf *ERG*-exprimierende Zellen mittels Zellviabilitätsmessung bestimmt werden (Abbildung 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Zunächst wurde die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), die Hybridisierung und statistische Auswertung der Hybridisierungsdaten an 8 Proben durchgeführt. Für die T-ALL Zelllinie Jurkat ist dies bereits im Vorfeld durchgeführt worden. In dieser Promotion wurden die ChIPs an den 6 primären Leukämieproben und der HL60 Zelllinie durchgeführt. Die Hybridisierung und Auswertung dieser Proben erfolgte in Kooperation mit Prof. Müller-Tidow am Universitätsklinikum Münster. Anschließend wurde mittels Bioinformatik eine Analyse angereicherter Signalwege und Funktionen durchgeführt. Darauf folgte die Validierung ausgewählter Gene mittels qrt-PCR und schließlich die Untersuchung des Effekts verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Viabilität *ERG* exprimierender Zellen.

Im Jurkat ChIP-chip (*ERG* vs Input bzw. IgG-Kontrolle) wurden für das Signifikanzniveau  $p < 0,001$  342 Gene als signifikant angereichert ermittelt [93]. Die Anzahl der ermittelten Targetgene der primären Leukämieproben war jedoch sehr variabel; dies ist am ehesten auf Unterschiede in der Effizienz der Immunopräzipitation und Hybridisierung zurückzuführen. Für die Konfidenzintervalle  $p < 0,001$  und  $p < 0,01$  waren die als signifikant identifizierten Genlisten teilweise zu klein um eine sinnvolle

## Ergebnisse

weiterführende Auswertung durchzuführen, weshalb sich alle weiteren Ergebnisse auf die Genlisten mit  $p < 0,05$  beziehen (Tabelle 5). Hier betrug die Anzahl signifikant angereicherter Gene zwischen 55 (AML A) und 3113 (AML D). Der *Cut-off* für den Anreicherungsfaktor gegenüber der IgG-Kontrolle ist bei 1,25 gesetzt worden. Demnach muss die mittlere Fluoreszenzintensität des jeweiligen Oligonukleotids in den Hybridisierungen 3 und 4 mindestens das 1,25-fache der in den Hybridisierungen 1 und 2 betragen. Dieser *Cut-off* ist so gewählt worden, um eine ausreichende Anzahl angereicherter Gene zu erhalten, die ein *Cut-off* bei z.B. 2-facher Fluoreszenzintensität nicht geliefert hätte. Andererseits wurden somit sehr geringere Fluoreszenzunterschiede mit einem Anreicherungsfaktor unter 1,25 für die weiteren Analysen eliminiert, da sie eher das Resultat von Schwankungen der Effizienz von Chromatin-Immunopräzipitation und Hybridisierung waren, als das einer tatsächlichen Anreicherung. Im Allgemeinen stellten sich jedoch derart geringe Fluoreszenzunterschiede selten signifikant dar.

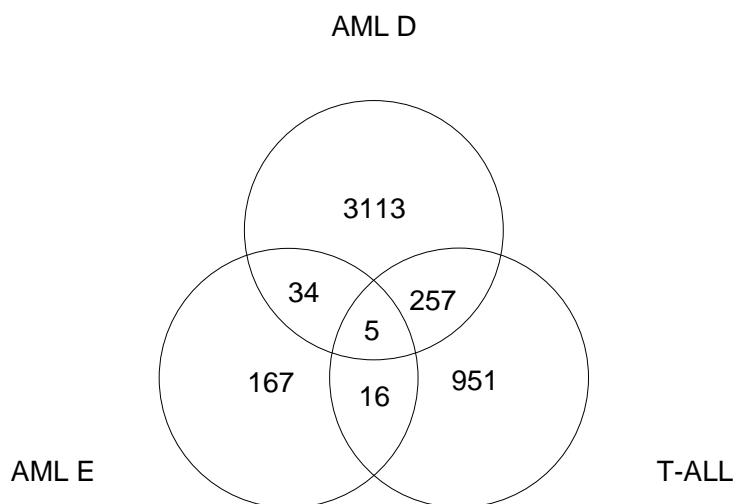
**Tab. 5: Darstellung der ChIP-chip Proben.** Aufgeführt sind die primären Leukämieproben sowie die Zelllinien HL60 und Jurkat mit ihrer *ERG* mRNA-Expression und Anzahl der mittels ChIP-chip als signifikant identifizierten Gene für das Konfidenzintervall  $p < 0,05$  mit einem Anreicherungsfaktor  $> 1,25$ . Die dargestellten Genlisten zeigen die Ergebnisse des Klassenvergleichs *ERG* gegen IgG bzw. das Ergebnis des  $\log_2$  Quotienten (*ERG*/ Input) (Jurkat,  $p < 0,01$ ).

	AML A	AML B	AML C	AML D	AML E	T-ALL	HL60	Jurkat
<i>ERG</i> mRNA-Expression	0,17	0,26	0,68	1,02	1,23	0,38	0,0	0,06
Anzahl signifikant angereicherter Gene ( $p < 0,05$ )	55	253	256	3113	167	951	253	342

Anschließend wurden die Genlisten der ChIP-chips untereinander verglichen um signifikante Targetgene zu ermitteln. So stimmte AML D mit AML E bei 34 Targetgenen überein, AML D mit T-ALL bei 257 und AML E mit T-ALL bei 16 (Abbildung 5). Hierunter waren 5 Gene, die in allen drei Proben eine signifikante Anreicherung zeigten (Tabelle 6). Insgesamt gab es 23 Gene, die in mindestens 3 der primären Leukämieproben angereichert waren (Tabelle S1 im Anhang) und 11 übereinstimmende Gene zwischen dem Jurkat ChIP-chip und mindestens 2 der primären Leukämieproben.

## Ergebnisse

Mutmaßliche falsch positiv identifizierte Targetgene wurden durch Vergleich mit den Ergebnissen der Negativkontrolle HL60 (fehlende *ERG*-Expression) eliminiert. Der prozentuale Anteil falsch positiver Targetgene lag zwischen 0,8 % (AML D) und 10,9 % (AML A).



**Abb. 5: Venn-Diagramm gemeinsamer Targetgene von AML D, AML E und T-ALL.** Für die Auswertung wurden die mittels Klassenvergleich gewonnenen Genlisten der ChIP-chips mit  $p < 0,05$  verwendet.

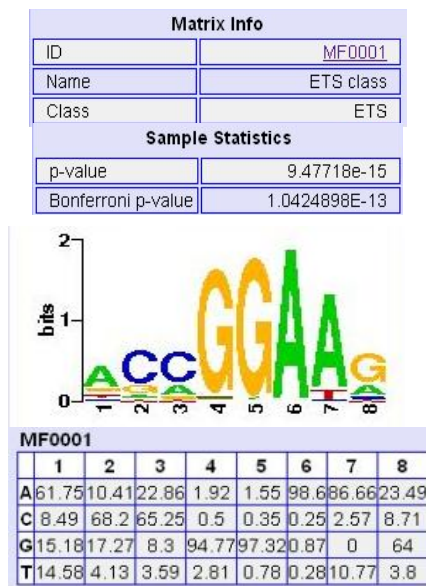
**Tab. 6: Auflistung der 5 gemeinsamen Targetgene zwischen AML D, AML E und T-ALL.** Dargestellt ist der Anreicherungsfaktor und der P-Wert für signifikant angereicherte, gemeinsame Targetgene der ChIP-chips AML D, AML E und T-ALL.

Gensymbol	Bezeichnung	AML D	AML E	T-ALL
		Anreicherungsfaktor (P-Wert)		
<i>ARHGEF2</i>	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	1,9 (0,03)	1,9 (0,04)	4,7 (0,05)
<i>BDKRB1</i>	Bradykinin receptor B1	1,7 (0,03)	2,1 (0,04)	4,6 (0,04)
<i>PCNP</i>	PEST proteolytic signal containing nuclear protein	2,9 (0,04)	2,2 (0,03)	5,8 (0,02)
<i>SIRT5</i>	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5	2,5 (0,03)	2,2 (0,03)	4,0 (0,05)
<i>WNT2B</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	4,4 (0,008)	2,0 (0,05)	4,3 (0,04)

## Ergebnisse

### 4.2 Anreicherung des ETS-Transkriptionsfaktorbindungsmotivs nach CHIP-chip

Die Bindung von ETS-TF an die Promotoren der regulierten Gene erfolgt präferentiell in jenen Bereichen der DNA, die die konservierte ETS-Konsensussequenz GGAA/T aufweisen [94]. Daher wurden die identifizierten Genlisten auf ihre Anreicherung dieser Sequenz in den zugehörigen Promotorregionen der mutmaßlichen Targetgene hin untersucht. Verwendet wurde die frei zugängliche Software Pscan [95], die Genlisten auf eine statistisch signifikante Anreicherung von Transkriptionsfaktorbindungsmotiven (Motifs) hin analysiert (Abbildung 6, Tabelle 7). Die Genliste der Negativkontrolle HL60 zeigte erwartungsgemäß keine Anreicherung des ETS-Motivs. AML B zeigte jedoch auch keine signifikante Anreicherung des ETS-Motivs. Dies kann auf einer hohen Anzahl falsch positiv identifizierter Targetgene innerhalb der Genliste beruhen und/ oder auf einer ineffizienten Immunopräzipitation bzw. Hybridisierung. Die Genlisten der Proben AML D und T-ALL zeigten zusätzlich zur Anreicherung des ETS-Motivs noch eine Anreicherung für die Bindungsmotive der Transkriptionsfaktorfamilien REL, bZIP und bHLH. Dies kann auf eine gemeinsame Regulation von Genen durch ERG und weitere TF hindeuten.



**Abb. 6: Repräsentative Darstellung der Auswertung der Transkriptionsfaktorbindungsmotive für AML D.** Gezeigt ist das Ergebnis des ETS-Motivs mit P-Wert (p-value) und Bonferroni P-Wert. Die graphische Darstellung des ETS-Bindungsmotivs GGAA/T repräsentiert einen Prozentwert für die Häufigkeit innerhalb der Genliste, mit der die entsprechende Base in der jeweiligen Position des Bindungsmotivs auftrat. So erschien Guanin in 95% der Fälle an Position 4, zu 97% in Position 5, Adenin zu 98% in Position 6 und an Position 7 zu 86% Adenin und 11% Thymin.

## Ergebnisse

**Tab. 7: Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen angereicherter Gene.** Dargestellt sind signifikant angereicherte Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit P-Wert und Bonferroni P-Wert. Die angereicherten Genlisten wurden mittels Pscan Software analysiert und es konnte eine Anreicherung des ETS-Bindungsstellen (Motif) GGAA/T für die Region -950 to +50 bp um den Transkriptionsursprung gezeigt werden. Die Proben AML B und HL60 (Negativkontrolle) zeigten keine Anreicherung dieses Bindungsstellen, AML D und T-ALL zeigten zusätzliche Anreicherungen für die Bindungsstellen weiterer Transkriptionsfaktoren.

	<b>Signifikant angereicherte Transkriptionsfaktorbindungsstellen</b>	<b>P-Wert</b>
AML A	ETS	0,05
AML B	keine	
AML C	ETS	0,03
AML D	ETS	9.48E-15
	REL	0,0001
AML E	bZIP	0,004
	ETS	0,02
T-ALL	ETS	0,04
	bHLH	0,04
HL60	keine	

### 4.3 ERG-regulierte Funktionen und Signalwege

Zur funktionellen Klassifizierung angereicherter Gene wurde die Software des DAVID bioinformatic resources [91, 92] sowie die Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software (Ingenuity® Systems [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) eingesetzt. Beiden Programmen ist gemeinsam, dass sie den Anteil von Genen eines bestimmten Signalwegs innerhalb einer gewissen Genliste (hier ChIP-chip Targetgen-Liste) mit dem prozentualen Anteil vergleichen, den Gene dieses Signalwegs am gesamten Genom einnehmen und daraus eine statistische An- bzw. Abreicherung errechnen. Analog erfolgt die Auswertung bei biologischen Funktionen und Proteindomänen. Im Unterschied zu DAVID ist bei IPA auch die Auswertung kleinerer Genlisten möglich und liefert durch eine feinere Unterteilung der Signalwege auch bei diesen Listen noch signifikante Ergebnisse. Bei beiden Programmen wurden die jeweiligen Genlisten hochgeladen und signifikant angereicherte Signalwege und Genfunktionen innerhalb der Listen identifiziert.

#### Ergebnisse des Jurkat ChIP-chip

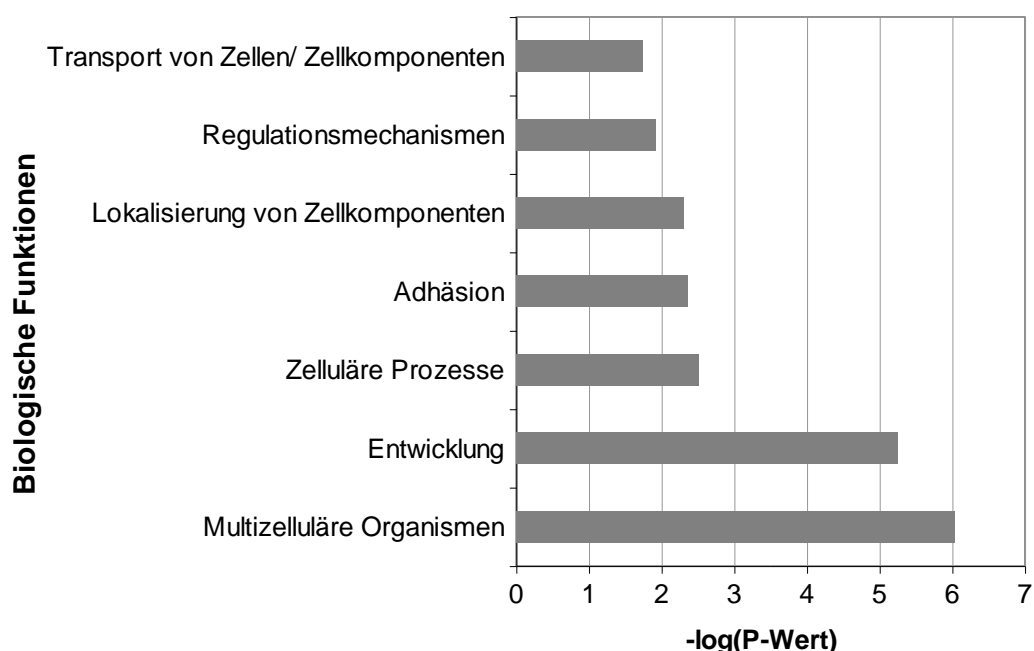
Im Jurkat ChIP-chip war vor allem die Identifikation globaler ERG-regulierter Funktionen von Interesse, so dass die funktionelle Genkategorie GOTERM\_BP\_1, die übergeordnete Genfunktionen analysiert, für die Auswertung herangezogen worden ist.

## Ergebnisse

Unter den angereicherten Genen des Jurkat ChIP-chips konnten Funktionen der zellulären Entwicklung und Regulation sowie Funktionen multizellulärer Organismen und des Transports von Zellen und Zellkomponenten und der zellulären Adhäsion ermittelt werden ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 8, Abbildung 7).

**Tab. 8: Signifikant angereicherte Funktionen (DAVID Server) nach ChIP-chip der Jurkatzelllinie.** Gezeigt ist die Genanzahl, die in dieser Probe für die jeweilige Funktion angereichert war, sowie der Anreicherungsfaktor gegenüber dem gesamten Genom, der P-Wert und der Benjamini Hochberg P-Wert (B-H P-Wert).

Biologische Funktion	Genanzahl	Anreicherungsfaktor	P-Wert	B-H P-Wert
Multizellulärer Organismus	115	1,5	9,3E-07	2,0E-05
Entwicklung	89	1,6	5,7E-06	6,0E-05
Lokalisierung von Zellkomponenten	73	1,3	0,005	0,02
Zelluläre Prozesse	211	1,1	0,003	0,02
Adhäsion	24	1,9	0,004	0,02
Regulationsmechanismen	155	1,1	0,01	0,04
Transport von Zellen/ Zellkomponenten	63	1,3	0,02	0,05



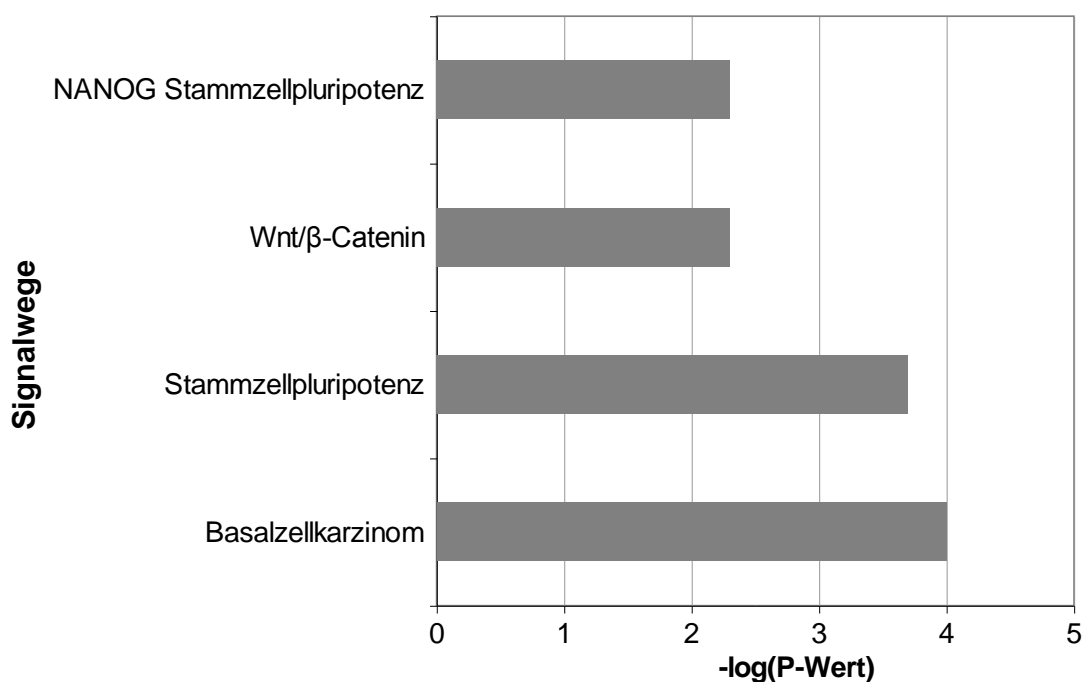
**Abb. 7: Angereicherte biologische Funktionen (GOTERM\_BP\_1,  $p < 0,05$ ) nach ChIP-chip der Jurkatzelllinie.** Dargestellt ist der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes, der sich aus dem Anteil von Genen der jeweiligen Funktion am gesamten Genom, bezogen auf die Größe der analysierten Genliste ergibt. Die Analyse wurde mittels DAVID bioinformatic resources durchgeführt.

## Ergebnisse

Die Analyse signifikant angereicherter Signalwege ergab für den Jurkat ChIP-chip Signalwege, die mit malignen Erkrankungen assoziiert sind (Basalzellkarzinom, Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg) sowie Signalwege der Regulation der Stammzellpluripotenz ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 9, Abbildung 8).

**Tab. 9: Signifikant angereicherte Signalwege nach ChIP-chip der Jurkatzelllinie.** Gezeigt ist die Genanzahl, der in dieser Probe am jeweiligen Signalweg beteiligten Gene sowie die Gesamtanzahl von humanen Genen, die an diesem Signalweg beteiligt sind, der P-Wert und der Benjamini Hochberg P-Wert (B-H P-Wert), sowie einige exemplarische Vertreter des jeweiligen Signalweges (IPA).

Signalweg	Genanzahl	Gesamtgenanzahl	P-Wert	B-H P-Wert
<b>Basalzellkarzinom</b> <i>BMP3, FZD5, FZD7, FZD8, WNT2, WNT11, WNT9A</i>	7	68	0,0001	0,02
<b>Stammzellpluripotenz</b> <i>BMP3, FGF2, FZD5, FZD7, FZD8, NTRK2, WNT2, WNT11, WNT9A</i>	9	148	0,0002	0,02
<b>Wnt/<math>\beta</math>-Catenin Signalweg</b> <i>CCND1, CDH1, FZD5, FZD7, FZD8, SOX3, SOX11, WNT2, WNT11, WNT9A</i>	10	168	0,005	0,02
<b>NANOG Stammzellpluripotenz</b> <i>BMP3, FZD5, FZD7, FZD8, GATA4, WNT2, WNT11, WNT9A</i>	8	114	0,005	0,02



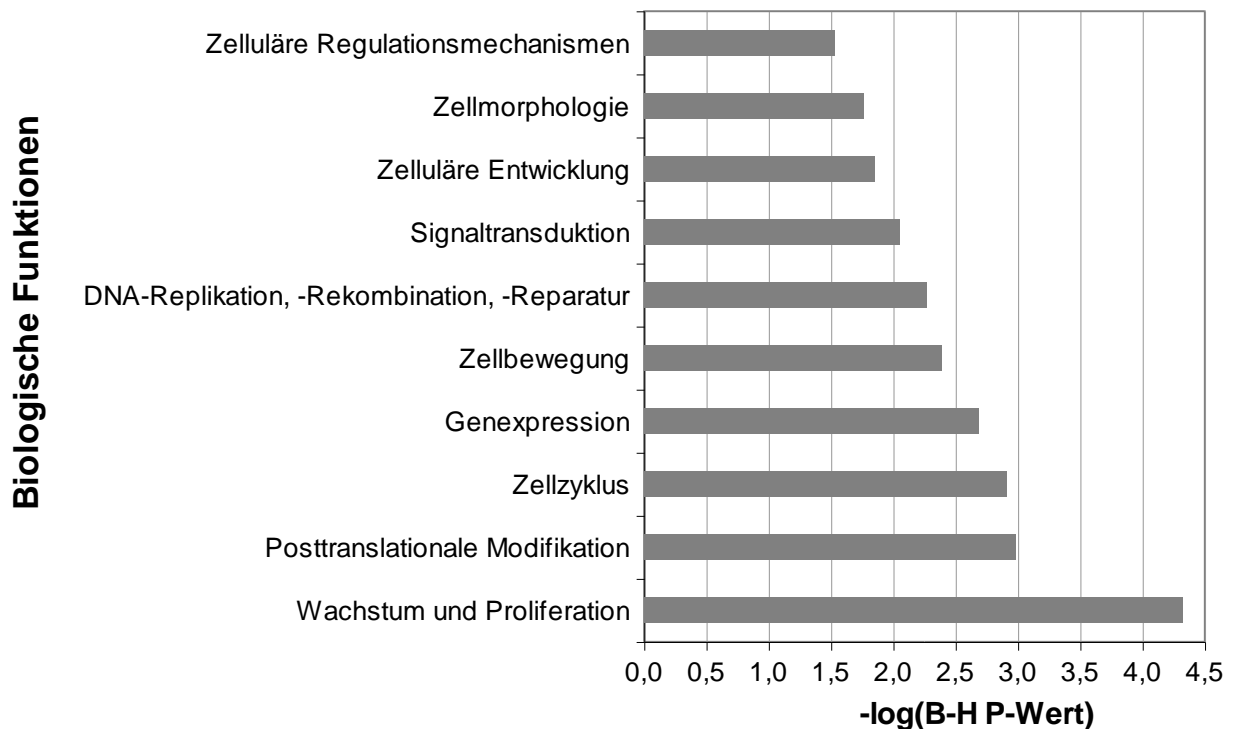
**Abb. 8: Signifikant angereicherte Signalwege des Jurkat ChIP-chip.** Dargestellt ist der negative Logarithmus des P-Wertes für signifikant angereicherte Signalwege ( $p < 0,05$ ) nach ChIP-chip der Jurkatzelllinie. Die Analyse wurde mittels IPA Software durchgeführt.



## Ergebnisse

### Ergebnisse der ChIP-chips der primären Leukämieproben

Bei der Analyse der primären Leukämieproben zeigte sich eine Anreicherung von Funktionen im Zusammenhang mit zellulärem Wachstum, Zellproliferation und Zellzyklus sowie DNA-Replikation, Genexpression und posttranslationaler Modifikation, aber auch von zellulären Regulationsmechanismen und zellulärer Entwicklung sowie der Signaltransduktion über *small molecules*, Zellmorphologie und –bewegung (Abbildung 9, Tabelle 10). Die genannten Funktionen waren mindestens in drei der primären Leukämieproben und nicht in der HL60 Kontrolle signifikant angereichert.



**Abb. 9: Signifikant angereicherte biologische Funktionen der primären Leukämieproben.** Dargestellt ist der Mittelwert des negativen Logarithmus der P-Werte für signifikant angereicherte biologische Funktionen, die mindestens in drei der primären Leukämieproben eine Anreicherung nach ChIP-chip aufwiesen (IPA).

## Ergebnisse

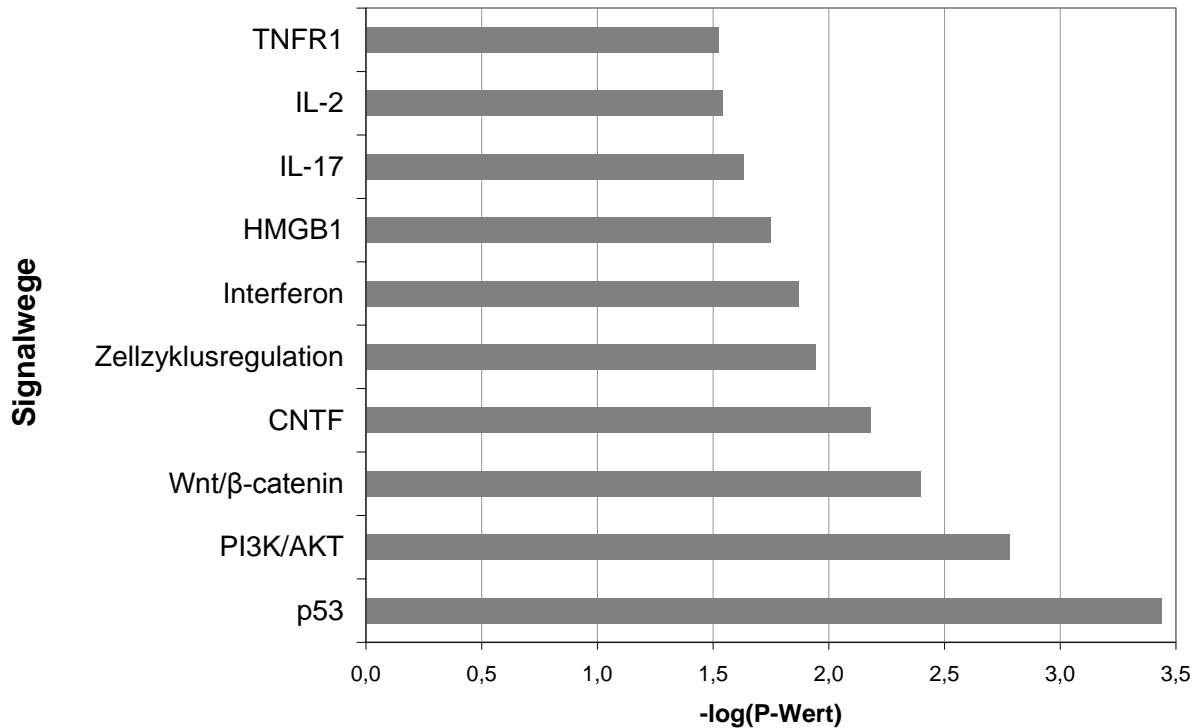
**Tab. 10: Signifikant angereicherte Genfunktionen, die in mindestens drei der primären Leukämieproben eine Anreicherung nach ChIP-chip aufwiesen.** Gezeigt ist für die jeweilige biologische Funktion die Leukämieprobe, in der die Anreicherung nachzuweisen war sowie der Benjamini-Hochberg P-Wert (B-H P-Wert) und die Anzahl an angereicherten Genen (IPA).

Biologische Funktion	Probenbezeichnung	B-H P-Wert	Genanzahl
Zelluläre Regulationsmechanismen	AML A	0,02	5
	AML C	0,05	4
	AML D	0,04	85
Zellmorphologie	AML A	0,02	5
	AML C	0,04	4
	AML D	0,007	107
Zelluläre Entwicklung	AML A	0,02	9
	AML C	0,05	4
	AML D	0,001	197
	T-ALL	0,04	96
Small Molecules	AML A	0,02	9
	AML C	0,04	4
	AML D	1,3E-05	135
	AML E	0,05	19
	T-ALL	0,03	70
DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur	AML A	0,02	3
	AML C	0,04	3
	AML D	3,6E-05	136
	T-ALL	0,03	60
Zellbewegung	AML A	0,02	4
	AML C	0,04	4
	AML D	1,2E-05	187
	T-ALL	0,04	61
Genexpression	AML A	0,03	5
	AML B	0,04	3
	AML C	0,05	3
	AML D	4,1E-08	320
	AML E	0,05	10
	T-ALL	0,0006	133
Zellzyklus	AML A	0,02	4
	AML C	0,04	4
	AML D	2,1E-07	184
	T-ALL	0,02	74
Posttranslationale Modifikation	AML D	1,3E-05	156
	AML E	0,003	18
	T-ALL	0,03	41
Wachstum und Proliferation	AML A	0,02	9
	AML D	1,5E-09	434
	T-ALL	0,004	123

Analog dazu zeigte sich eine Anreicherung von kanonischen Signalwegen, die elementare zelluläre Prozesse, wie z.B. den Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung, Zellwachstum und Apoptose regulieren (Abbildung 10, Tabelle 11). Dazu gehören z.B.

## Ergebnisse

der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg, die Interleukin- und Interferon-vermittelten Prozesse, der PI3K/ AKT Signalweg und der p53 Signalweg. Dabei war der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg sowohl in der Jurkatprobe als auch in den primären Leukämieproben AML B, AML D und T-ALL signifikant angereichert (IPA).



**Abb. 10: Signifikant angereicherte Signalwege der primären Leukämieproben.** Dargestellt ist der Mittelwert des negativen Logarithmus der P-Werte für signifikant angereicherte Signalwege, die in mindestens drei der primären Leukämieproben eine Anreicherung nach ChIP-chip aufwiesen (IPA).

## Ergebnisse

**Tab. 11: Mittels IPA Software identifizierte, signifikant angereicherte Signalwege, die in mindestens drei der primären Leukämieproben eine Anreicherung nach ChIP-chip aufwiesen.** Gezeigt ist für den jeweiligen Signalweg die Leukämieprobe, in der die Anreicherung nachzuweisen war, sowie der P-Wert und die Anzahl angereicherter Gene, die Gesamtanzahl von Genen in diesem Signalweg und der sich daraus ergebende Quotient.

Signalwege	Probenbezeichnung	P-Wert	Anzahl angereicherter Gene/ Gesamtzahl von Genen	Quotient
TNFR1	AML D	0,02	12/52	0,24
	AML B	0,03	3/52	0,06
	T-ALL	0,04	6/52	0,12
IL-2	T-ALL	0,01	8/59	0,14
	AML C	0,05	3/59	0,05
	AML B	0,05	3/59	0,05
IL-17	AML D	0,01	18/77	0,23
	AML C	0,02	4/77	0,05
	T-ALL	0,05	8/77	0,10
HMGB1	AML D	0,008	22/99	0,22
	T-ALL	0,01	11/99	0,11
	AML B	0,05	4/99	0,04
Interferon	AML D	0,004	11/34	0,32
	AML B	0,01	3/34	0,09
	AML E	0,04	2/34	0,06
Zellzyklusregulation	AML D	0,006	19/87	0,22
	T-ALL	0,009	10/87	0,12
	AML B	0,03	4/87	0,05
CNTF	AML D	0,0005	16/52	0,31
	T-ALL	0,02	7/52	0,14
	AML C	0,03	3/52	0,06
Wnt/ $\beta$ -Catenin	T-ALL	0,0004	21/173	0,12
	AML D	0,004	36/173	0,21
	AML B	0,04	6/173	0,03
PI3K/AKT	AML D	0,00008	32/132	0,24
	T-ALL	0,002	15/132	0,11
	AML E	0,03	4/132	0,03
p53	AML D	0,0001	27/98	0,28
	AML B	0,0005	7/98	0,07
	T-ALL	0,0007	14/98	0,14

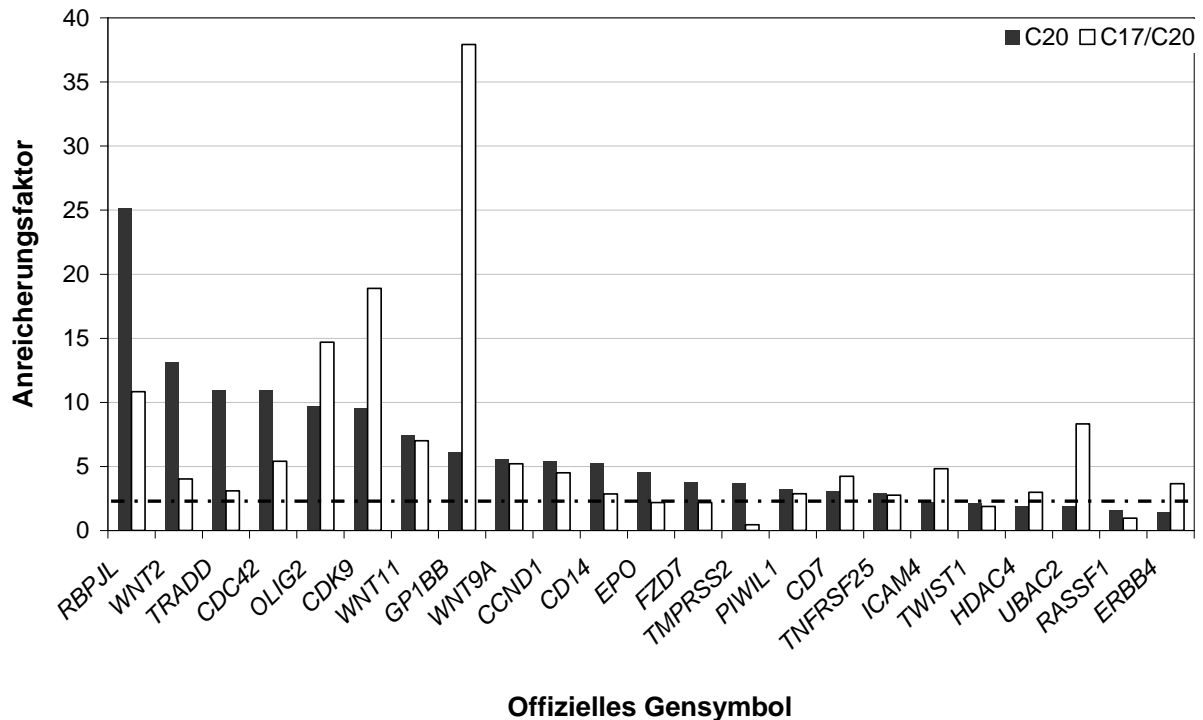
Da alle der angereicherten Signalwege eine Signaltransduktion beinhalten, die auf Kinasen und der damit verbundenen nachgeschalteten Phosphorylierung und somit Aktivierung oder Inaktivierung weiterer Signalmoleküle beruht, ist es nicht weiter verwunderlich, dass sich auch eine Anreicherung von Proteinkinasen nachweisen lässt. So sind in AML D die Proteinkinasen im Allgemeinen ( $p=0,0003$ ) und Serin-/Threoninkinasen im Speziellen ( $p=0,001$ ) angereichert.

## 4.4 Validierung von Targetgenen

### 4.4.1 Validierung von Targetgenen in der Zelllinie Jurkat

Zur Validierung der Anreicherung durch ChIP-chip wurden qrt-PCR Assays an den immunopräzipitierten DNA-Lysaten, die für die Hybridisierung verwendet worden waren, durchgeführt. Für die Validierung der im Jurkat ChIP-chip identifizierten mutmaßlichen Targetgene wurden, basierend auf PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), 23 Gene mit Funktionen in Onkogenese, hämatologischen Erkrankungen oder zellulärer Entwicklung ausgewählt, für deren Promotorregion Primer (siehe 3.1.10) entworfen wurden. Diese Primer wurden entweder für jene Region ausgewählt, die bei der *Sliding Window Analyse* das Maximum (peak) lieferte, bzw. wenn das für diese Region auf Grund z.B. eines zu hohen GC-Gehalts nicht möglich war, wurde die angegebene Promotorregion der *Cold Spring Harbor Laboratory Transcriptional Regulatory Element (TRED)* Datenbank verwendet. Dabei wurde in den meisten Fällen versucht einen Bereich für die Primer auszuwählen, der das stark konservierte ETS-Bindungsmotiv 5'-GGAA/T-3' aufwies. Mittels qrt-PCR wurde der Cycle Threshold ( $C_T$ -Wert) des jeweiligen Primerpaars bestimmt und der Anreicherungsfaktor gegenüber der Kontrolle (Gesamtchromatin) ermittelt. Von den 23 ausgewählten Genen konnten 17 mittels qrt-PCR bestätigt werden (Abbildung 11). Der Schwellenwert für eine relevante Anreicherung wurde dabei analog zu früheren Publikationen bei einer 2-fachen Anreicherung gesetzt [96, 97]. Unter den validierten Genen befinden sich mehrere Gene des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs (*WNT2*, *WNT9A*, *WNT11*, *FZD7* und *CCND1*), Gene mit Funktion in der Hämatopoese (*CD7*, *CD14* und *EPO*) sowie Gene der Transkriptionsregulation (*RBPJL*, *CDK9*, *TWIST1*, *HDAC4*, *RXRA*, und *OLIG2*). Außerdem konnte auch eine Anreicherung für *TMPRSS2* gezeigt werden, das Bestandteil des ERG-Fusionsproteins in 50 % aller primären Prostatatumoren ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass ERG den Promotor von *TMPRSS2* bindet und so die Expression des Fusionsproteins reguliert. Die Anreicherung von *GP1BB*, das den Oberflächenmarker CD42 kodiert, wird durch eine frühere Studie zu Targets des TFs ERG bestätigt [98].

## Ergebnisse



**Abb. 11: Validierung von Targetgenen mittels qrt-PCR an den Chromatinproben der Jurkatzelllinie.** Dargestellt ist der Anreicherungs faktor der Promotorregionen ausgewählter Gene für einen repräsentativen Versuch der beiden Versuchsgruppen (einzelner Antikörper - C20 und doppelter Antikörper - C17/C20) gegenüber der Kontrolle (Gesamtchromatin). Ein Anreicherungs faktor > 2 wurde als relevante Anreicherung gewertet.

### 4.4.2 Validierung von Targetgenen an primären Leukämieproben

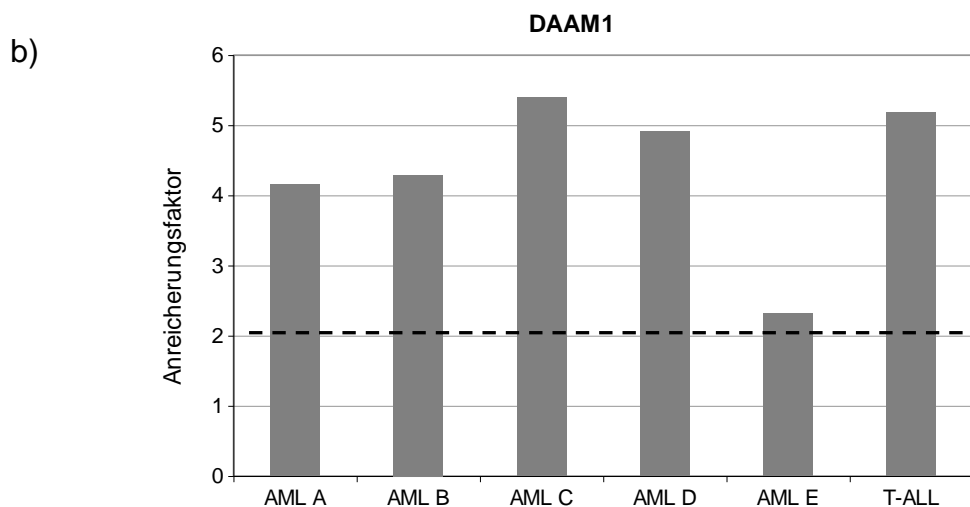
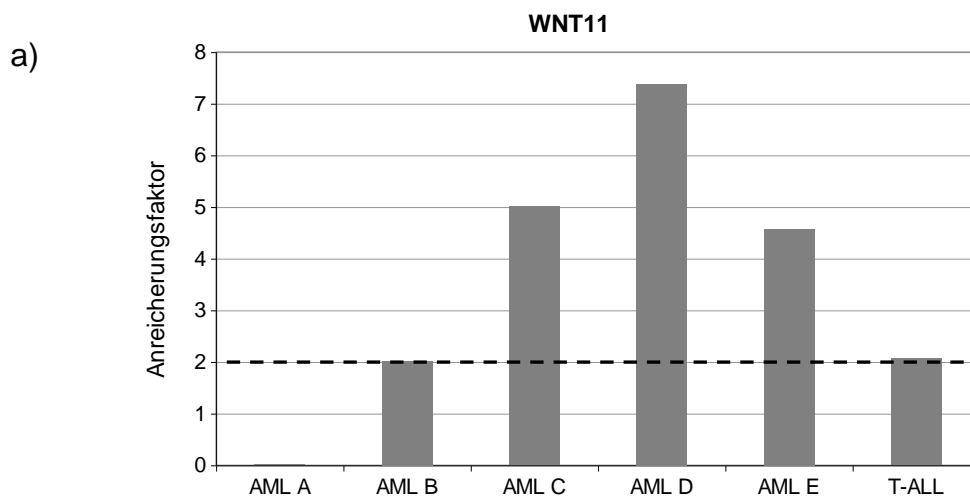
Analog wurde die Hybridisierung der primären Leukämieproben ebenfalls mittels qrt-PCR validiert, jedoch wurden auf Grund der hohen Heterogenität der Proben lediglich 5 Gene für die Validierung ausgewählt. Dazu gehörte zum einen das mutmaßliche Targetgen *WNT11*, für das eine Anreicherung in der Jurkat-Probe sowohl nach ChIP-chip als auch mittels qrt-PCR gezeigt werden konnte und das ferner in den Proben AML D und T-ALL nach ChIP-chip angereichert war. Ferner wurde für die Gene *DAAM1*, *MAP3K4*, *MAPK9* und *TCF3*, die in mindestens einer der primären Leukämieproben eine Anreicherung mittels ChIP-chip zeigten, eine Koexpression mit *ERG* in Prostataproben beschrieben [99]. Daher wurde diese Anreicherung mittels qrt-PCR validiert. Für die angegebenen Gene wurden Promotorprimer für die Region designed, die das mittels ChIP-chip angereicherte Oligonukleotid beinhaltet und qrt-PCR durchgeführt.

## Ergebnisse

Durch eine mindestens zweifache Anreicherung gegenüber der IgG-Kontrolle konnte die Anreicherung des *WNT11* Promotors in 5 der 6 Patientenproben in mindestens einer Versuchsgruppe gezeigt werden (Abbildung 12a). Damit ist die Anreicherung durch PCR in 2 zusätzlichen Patientenproben gezeigt worden (im ChIP-chip war *WNT11* lediglich in AML C, AML D und T-ALL angereichert). Dies entspricht der höheren Sensitivität der PCR. Dabei konnte keine direkte Korrelation zwischen der Höhe der Promotoranreicherung von *WNT11* und der *ERG* mRNA-Expression der Leukämieproben gesehen werden.

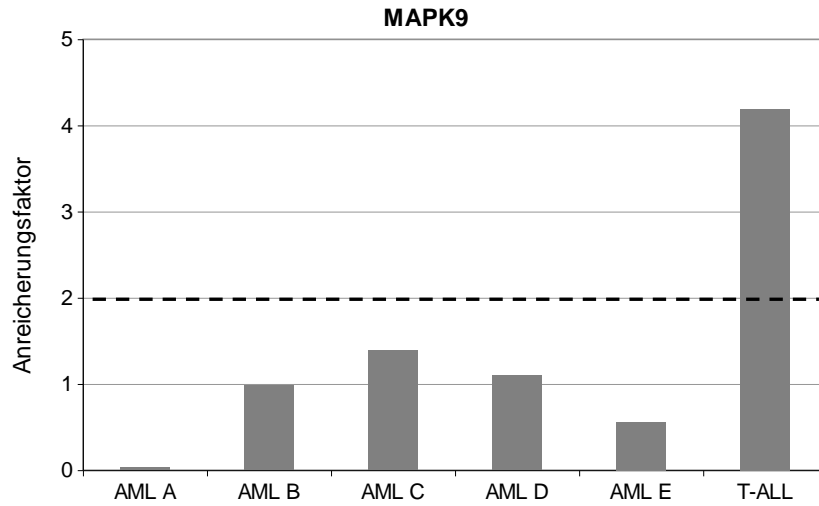
Für den Promotor von *DAAM1* konnte eine mindestens 2-fache Anreicherung gegenüber der IgG-Kontrolle in allen 6 Leukämieproben gezeigt werden (Abbildung 12b).

Für die übrigen getesteten Gene zeigte sich eine Anreicherung mittels qrt-PCR lediglich in einer primären Leukämieprobe (Abbildung 12c-e).

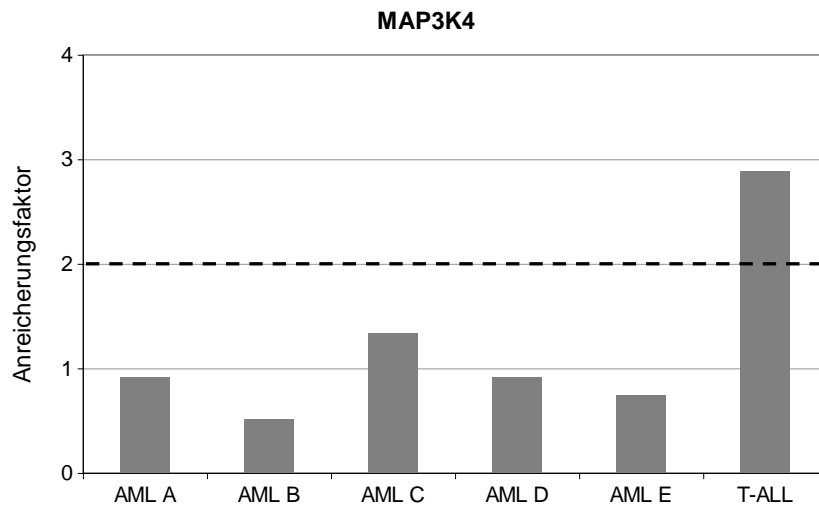


## Ergebnisse

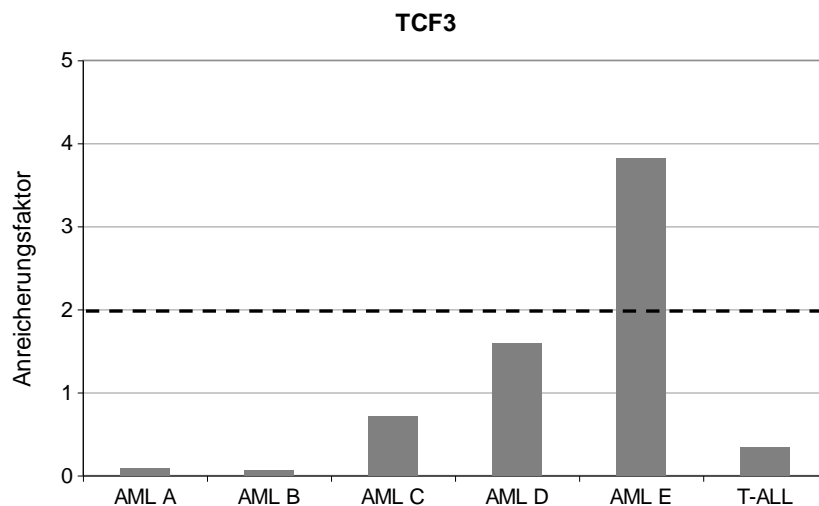
c)



d)



e)



**Abbildung 12 a-c: Ergebnisse der qrt-PCR für ausgewählte Targetgene in den primären Leukämieproben.** Dargestellt ist der mittels qrt-PCR ermittelte Anreicherungsfaktor gegenüber IgG eines repräsentativen Versuchs für die potentiellen Targetgene (a) *WNT11*, (b) *DAAM1*, (c) *MAPK9*, (d) *MAP3K4* und (e) *TCF3*.



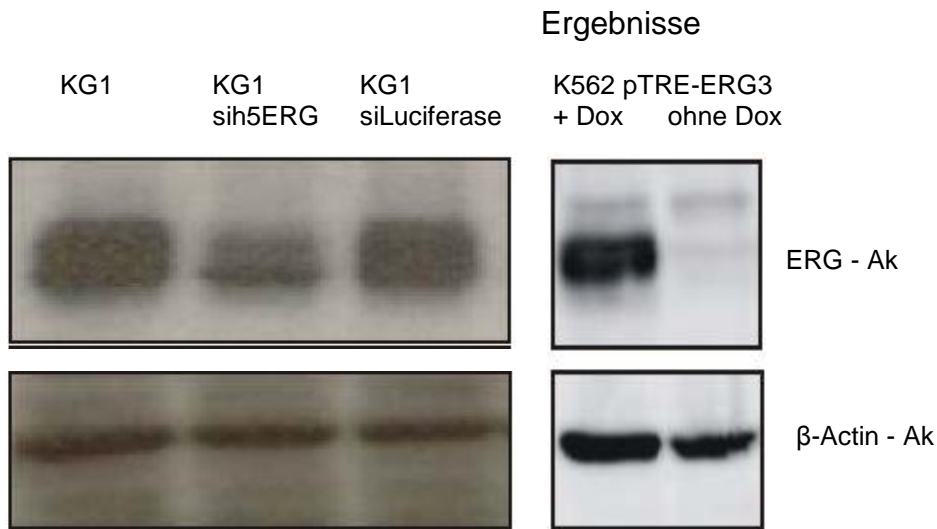
## 4.5 Expression von Targetgenen nach *ERG*-Modulation

### 4.5.1 Modulation der *ERG*-Expression (*siERG/tet-on*)

Da ein *ERG*-gebundener Promotor im ChIP-chip Versuch noch keine Aussage darüber zulässt, ob und inwiefern *ERG* funktionellen Einfluss auf die Expression des potentiellen Targetgens ausübt, wurde die *ERG*-Expression experimentell moduliert. Dazu wurde in KG1 Zellen, die eine ausreichende Expression von *ERG* zeigen, ein siRNA *knock down* der *ERG* mRNA (*sih5ERG*) durchgeführt und so die *ERG*-Expression reduziert. Durch Transfektion mit siRNA wurde in wiederholten Versuchen eine Reduktion der *ERG* mRNA-Expression in KG1 Zellen um 60, 70 und 98 % erzielt.

Des Weiteren wurde für die Expression der *ERG* mRNA und somit der Proteinbiosynthese von *ERG* ein durch Dox induzierbares Vektorkonstrukt (*tet-on*) in K562 Zellen eingebracht, die *ERG* natürlicherweise nicht exprimieren. Die Anreicherung der *ERG* mRNA nach *tet-on* in K562 lag zwischen dem 60- und 120-fachen der Kontrolle ohne Induktion mit Dox.

Der Nachweis erfolgte jeweils mittels multiplex qrt-PCR und *Western Blot*. Die *ERG* Detektion im Blot erfolgte mit dem *ERG*-C20 Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Kammern wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin verwendet. Die Aufnahmen der *Western Blots* zeigen sowohl eine Reduktion des *ERG*-Proteingehalts in den KG1 Zellen mit *sih5ERG* Behandlung als auch ein Vorhandensein des *ERG*-Proteins in transfizierten K562 Zellen nach Induktion mit Dox im Gegensatz zu der Kontrolle ohne Zugabe von Dox (Abbildung 13).

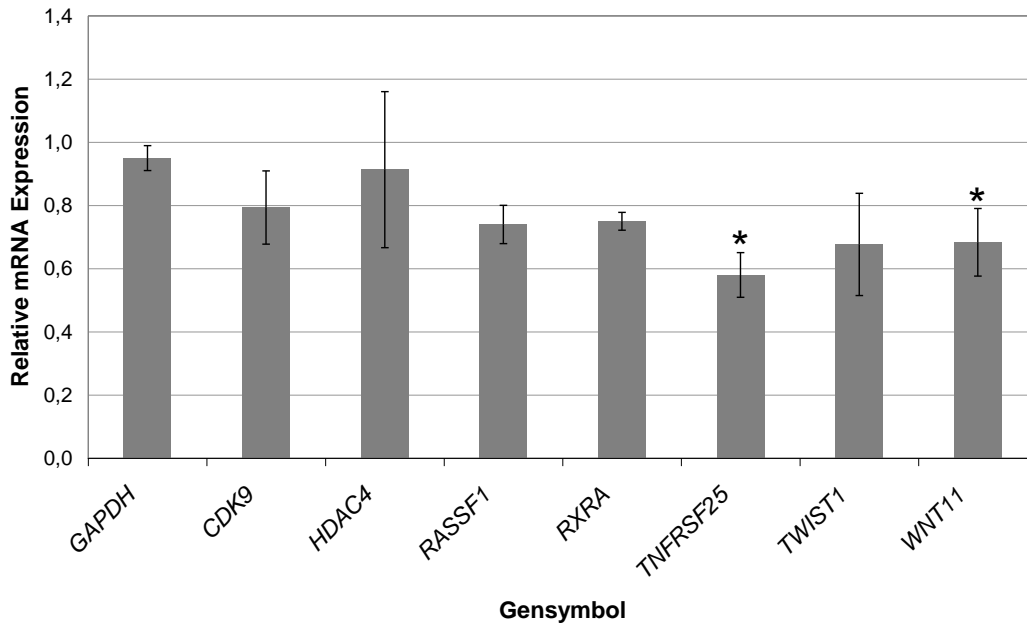


**Abb. 13: Ergebnisse des *Western Blots*.** Gezeigt ist der *Western Blot* für KG1 Zellen mit *knock down* von *ERG* (KG1 sih5ERG) und der Kontrolle (KG1 siLuciferase) sowie von K562 Zellen transfiziert mit pTRE-ERG3 Vektor mit und ohne Induktion durch Dox. Gezeigt sind die Detektion mit ERG-spezifischem Antikörper und die Detektion von β-Actin als Ladekontrolle.

#### 4.5.2 Expression von Targetgenen nach *ERG knock down*

Die mit siRNA transfizierten Zellen wurden nach 48 h lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Von den 17 im Jurkat ChIP mittels qrt-PCR der Promotorregion validierten Targetgenen (siehe Abbildung 11) sind 9 regulär in KG1 Zellen exprimiert (*CDK9*, *HDAC4*, *RASSF1*, *RXRA*, *STAT5*, *TNFRSF25*, *TWIST1*, *WNT9A* und *WNT11*). Zur Ermittlung der mRNA-Expression der Targetgene wurden RT-PCR Assays in 3 Wiederholungen durchgeführt. Um eine gleichmäßige Qualität des DNA Materials in allen Versuchen zu gewährleisten, wurden nur jene Läufe für die Auswertung verwendet, bei denen die Expression des *House Keeping Gens GAPDH* in Versuchsgruppe und Kontrolle annähernd gleich war ( $\Delta C_T = 1,0 \pm 0,05$ ). Der knock down von *ERG* ging konsequent mit einer verminderten Expression der Gene *RASSF1*, *RXRA* und *TWIST1* einher (Abbildung 14). Eine signifikant geringere Expression konnte für die Gene *WNT11* und *TNFRSF25* gezeigt werden, mit einer Reduktion der Expression um 40 – 50 % (Normalisierung nach *GAPDH* und Berechnung der Signifikanz *sih5ERG* ≠ *siLuciferase* mittels Student's T-Test).

## Ergebnisse



**Abb. 14: Ergebnisse der RT-PCR Assays in KG1 Zellen für die an Hand des Jurkat CHIP-chips ausgewählten Targetgene.** Dargestellt ist die relative mRNA-Expression als Mittelwert mit Standardabweichung (drei Wiederholungen) der Zellen nach siERG Transfektion im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit siLuciferase). \* :  $p < 0,05$  (Signifikanz si5ERG gegenüber siLuciferase).

### 4.5.3 Validierung von Targetgenen an K562 Zellen nach *ERG*-Induktion

Die 17 mittels qrt-PCR der Promotorregion validierten Targetgene wurden im *tet-on* System auf ihre Expression untersucht. Von diesen 17 Genen war *WNT11* konsequent und am stärksten mit *ERG* koreguliert. In den Einzelklonen zeigte sich eine relative *WNT11* Expression mit einer 10- bis 100- fachen Anreicherung gegenüber der Kontrolle (transfizierte K562 Zellen ohne Dox Zugabe) (Abbildung 15). In untransfizierten K562 Zellen war die *WNT11* mRNA überhaupt nicht detektierbar.

Von den übrigen getesteten Genen waren nur *LEF1*, *CDK9*, *ICAM4*, *GP1BB*, *CD7*, *TNFRSF25* und *GATA4* in K562 Zellen exprimiert. Jedoch zeigten lediglich *TNFRSF25* und *GATA4* eine erhöhte Expression nach einer Induktion von mehr als 7 Tagen, die übrigen Gene waren in ihrer Expression unbeeinflusst durch *ERG*-Induktion (Abbildung 16).

## Ergebnisse

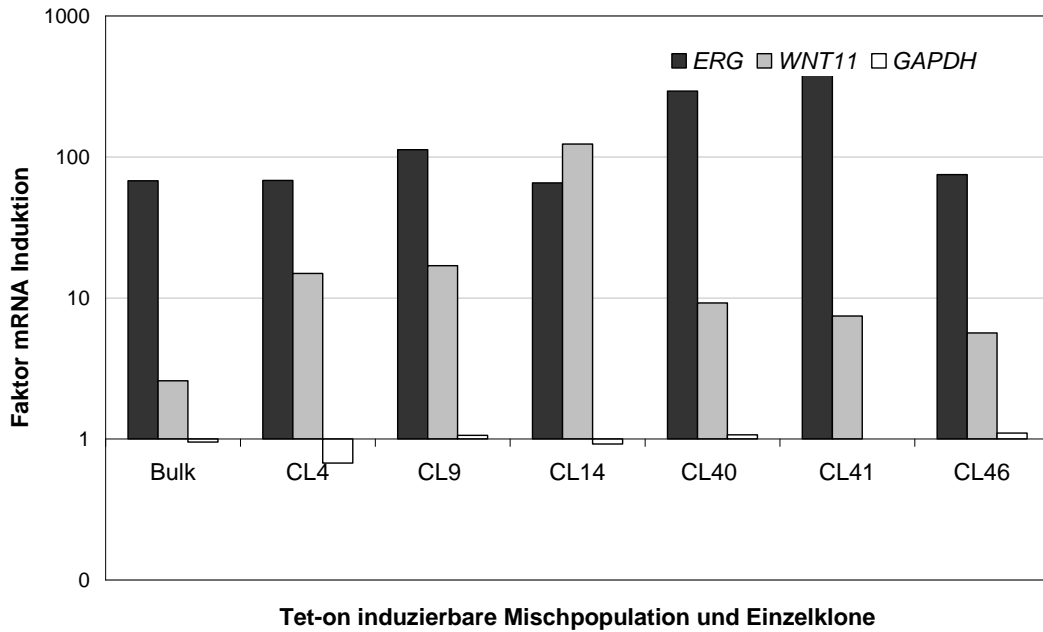


Abb. 15: Faktor der mRNA-Induktion der Gene *ERG*, *WNT11* und *GAPDH* in induzierten K562 Zellen gegenüber nicht induzierten, für die Mischpopulation (Bulk) und die Einzelklone.

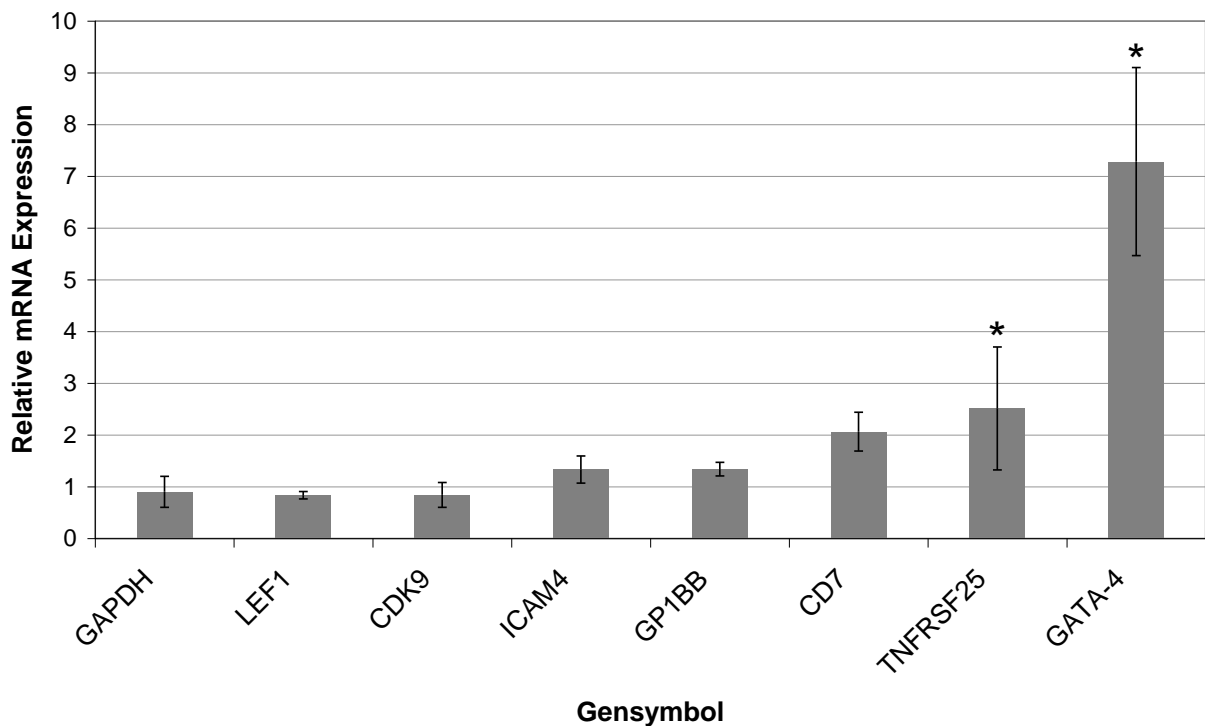
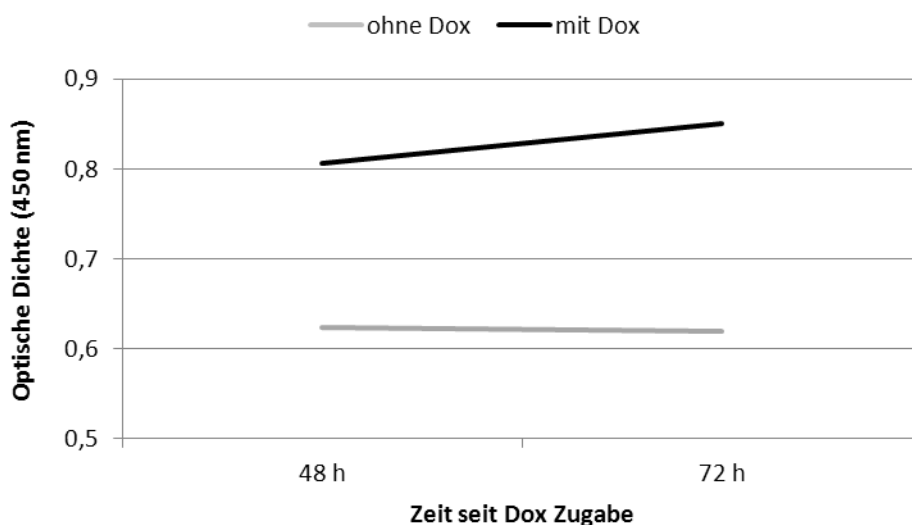


Abb. 16: Relative mRNA-Expression der in K562 exprimierten potentiellen ERG-Targetgene in induzierten gegenüber uninduzierten K562 Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 2 Wiederholungen. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's T-Test bestimmt. \* :  $p < 0,05$  (Signifikanz +Dox gegenüber -Dox).

## 4.6 Einfluss von *ERG* auf Proliferation und Resistenzverhalten

### 4.6.1 Einfluss der *ERG*-Expression auf die Proliferation

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der von *ERG* induzierten Targetgene und regulierten Signalwege wurden Proliferationsassays an K562 Zellen mit induzierbarer *ERG*-Expression (*tet-on*) durchgeführt. Da sich in der bioinformatischen Auswertung der ChIP-chip Genlisten eine Anreicherung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs und weiteren intrazellulären Signalwegen, wie z.B. PI3K/AKT-, HMGB1-, TNFR1-, CNTF- und Interferon-Signalweg zeigte, die unter anderem die zelluläre Proliferation regulieren, wurden zunächst Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der *ERG*-induzierten Zellen mittels WST-Test durchgeführt. Gemessen wurde die Proliferation 48 und 72 Stunden nach Beginn der Induktion mit Dox. Es zeigte sich für alle getesteten Klone ein Proliferationsvorteil der mit Dox induzierten Zellen gegenüber der Kontrolle (Abbildung 17). Dabei zeigten sie zwischen 125 und 140 % der Proliferationsrate der Kontrolle, die jedoch mutmaßlich auf Grund hoher Schwankungen nicht signifikant ausfiel.



**Abb. 17: Proliferation der Zellen mit und ohne Zugabe von Dox 48 und 72 h nach Beginn der Behandlung mit Dox für einen repräsentativen Klon.** Dargestellt ist die optische Dichte eines repräsentativen Klons 48 und 72 Stunden nach Zugabe von Dox für Zellen mit (schwarz) und ohne Dox (grau - Kontrolle).

### 4.6.2 Einfluss von *ERG* auf die Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren

Die Ergebnisse der ChIP-chip Versuche zeigten eine Anreicherung für intrazelluläre Signalwege wie WNT/ $\beta$ -Catenin und PI3K/AKT-, HMGB1-, TNFR1-, CNTF- sowie

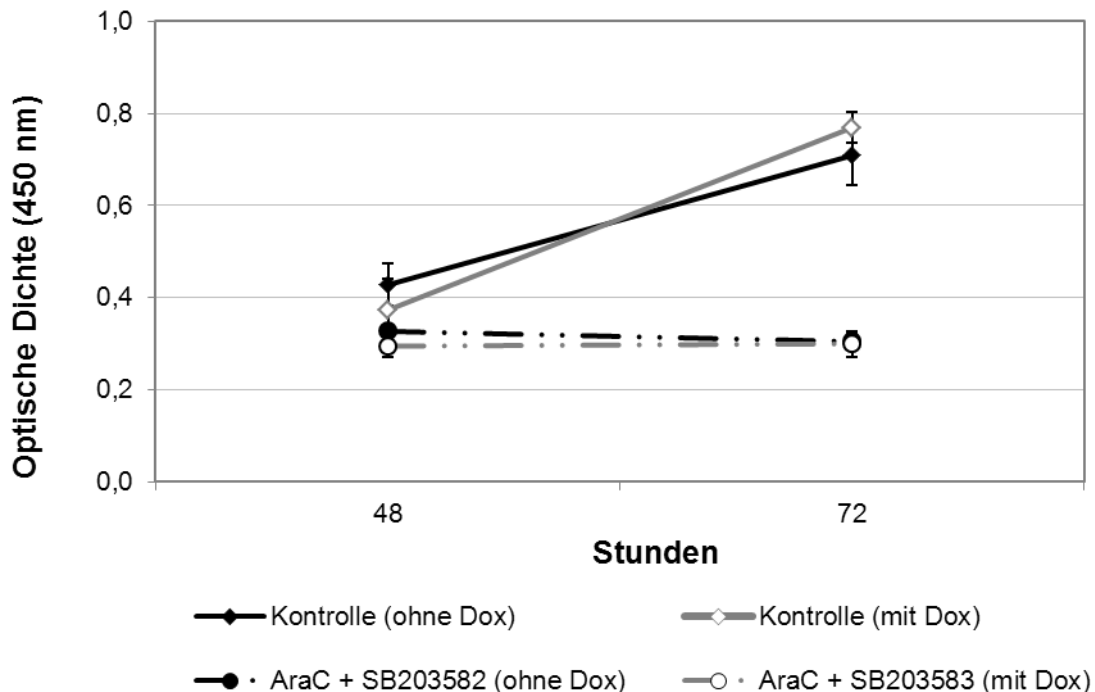
## Ergebnisse

Interleukin- und Interferon-Signalweg, die ihre zelluläre Signaltransduktion teilweise über Kinasen, darunter vor allem über MAP-Kinasen, vermitteln. Ferner zeigten die Patientenproben eine Anreicherung für Serin-/ Threoninkinasen, zu denen die MAP-Kinasen gehören. Deshalb wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche MAP-Kinaseinhibitoren sowie der Multikinaseinhibitor Sorafenib, der Glycogensynthase-Kinase Inhibitor BIO und der Antimetabolit AraC, der regulär in der antineoplastischen Therapie eingesetzt wird, an K562 Zellen mit induzierbarer *ERG*-Expression getestet, um das Ansprechen *ERG*-exprimierender Zellen auf diese Substanzen zu untersuchen. Die getesteten MAP-Kinaseinhibitoren inhibieren in höherer Konzentration mehrere verschiedene MAP-Kinasen, sind jedoch in niedriger Konzentration spezifisch. Die Moleküle SL327 und U0126 inhibieren vorrangig MEK Kinasen, während SP600125 bevorzugt JUN-Kinasen inhibiert und SB203580 p38 Moleküle. Die geeignete Konzentration der Kinasen wurde an Hand von publizierten Daten ermittelt [100, 101] und an nativen K562 Zellen optimiert. Anschließend wurden die *ERG*-induzierbaren K562 Zellen mit diesen Substanzen in einer Konzentration von 25 µM und mit AraC mit einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert, sowohl einzeln als auch beide Substanzen kombiniert. Die Konzentration von AraC wurde bewusst gering gehalten, um einen zytotoxischen Effekt durch die Inhibitoren nicht zu überdecken. Gezeigt sind die Resultate für SB203580 als repräsentatives Ergebnis, da alle Ergebnisse ähnlich ausfielen. Um einen proliferationshemmenden Effekt durch das Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurden die Zellen parallel mit der gleichen Konzentration an DMSO inkubiert, wie in den Verdünnungen der Inhibitoren vorhanden. Es zeigte sich kein Effekt auf die Proliferation (Daten der DMSO-Versuche nicht gezeigt).

Die Behandlung von K562 Zellen mit AraC und einem MAP-Kinaseinhibitor führte zu einem additiven Effekt auf die Proliferationshemmung gegenüber der Behandlung mit AraC allein (nicht dargestellt). Dies konnte bereits durch frühere Arbeiten zu dem Effekt von MAP-Kinaseinhibitoren auf andere leukämische Zelllinien gezeigt werden [100, 101] und wird dadurch erklärt, dass die zytotoxische Wirkung von AraC eine Aktivierung von MAP-Kinasen und somit Inhibierung der Apoptose und Proliferationsaktivierung bewirkt, die dann durch Zugabe eines MAP-Kinaseinhibitors verhindert wird. Dieser Effekt konnte gezeigt werden, allerdings ließen sich keine Unterschiede in der Proliferation nach Behandlung mit den MAP-Kinaseinhibitoren der mit Dox induzierten Zellen und der Kontrolle zeigen (Abbildung 18).

## Ergebnisse

Eine Limitation dieses Versuchs besteht allerdings in der Tatsache, dass K562 Zellen die BCR-ABL Kinase tragen und somit per se einen aktivierten MAPK Signalweg haben, so dass eine möglicherweise zusätzliche Aktivierung des Signalwegs durch ERG nicht ausreichend ins Gewicht fallen könnte.

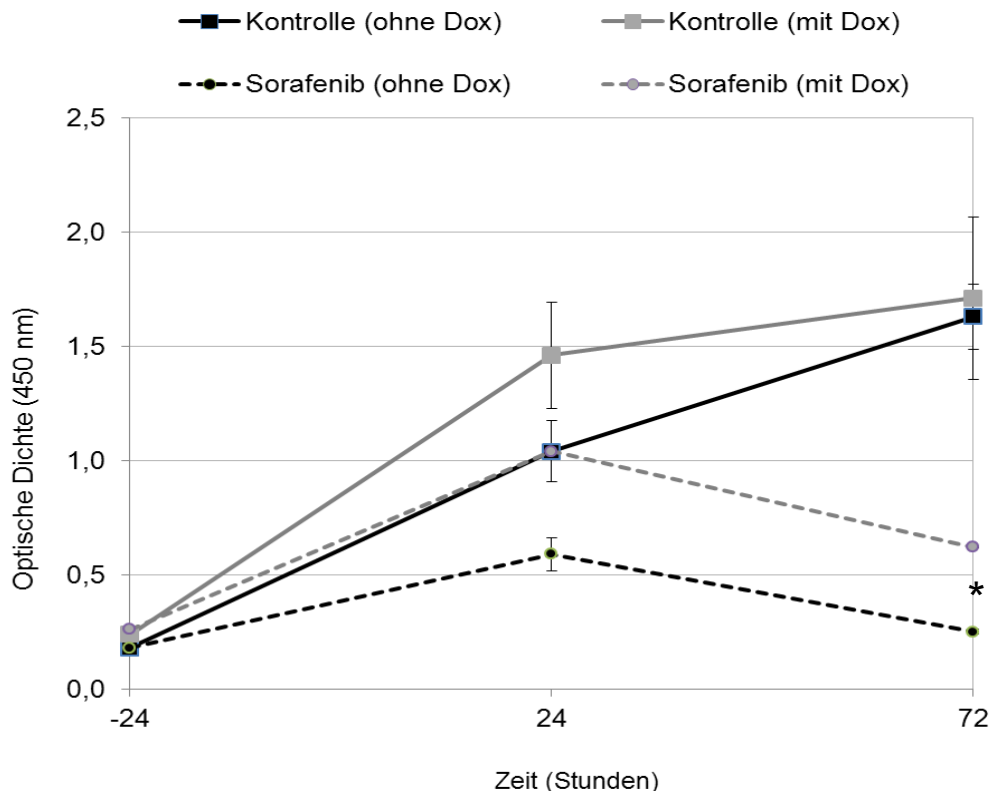


**Abb. 18: WST-Test zum Resistenzverhalten *ERG*-exprimierender Zellen gegenüber MAP-Kinaseinhibitoren.** Gezeigt ist das Ergebnis des WST-Tests nach Behandlung von K562 Zellen mit (grau) und ohne (schwarz) Induktion von *ERG* durch Zugabe von Dox nach 48 und 72 h. AraC wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml und der Kinaseinhibitor SB203580 von 25 µM verwendet (gestrichelt).

Weiterhin wurde der Effekt einer Behandlung mit Sorafenib auf K562 Zellen untersucht. Sorafenib wird bei Patienten mit Nierenzellkarzinom eingesetzt und wird seit Kurzem auch als Therapieoption bei AML getestet [102, 103]. Es ist ein Multikinaseinhibitor, der vorrangig Tyrosinkinase wie den VEGF-Rezeptor, c-KIT oder FLT3 inhibiert. Außerdem ist Sorafenib ein Inhibitor von Raf, welches Bestandteil des Ras/Raf/MEK Signalwegs und in nahezu 50% aller akuten Leukämien aberrant aktiviert ist [104]. Nach Zugabe von Sorafenib (10 µM) zeigten die induzierten Zellen einen signifikanten Proliferationsvorteil gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19). Dies war bereits nach 48 h messbar und blieb über die gesamte Messperiode (72 h) erhalten. Allerdings war dieser Effekt nur dann messbar, wenn der Zugabe von Sorafenib eine Induktion der *ERG*-Expression mit Dox von mindestens 72 h vorausgegangen war. Dies deutet darauf hin,

## Ergebnisse

dass der durch ERG vermittelte Effekt auf die Resistenz gegenüber Sorafenib erst verzögert einsetzt.



**Abb. 19: Proliferation von K562 Zellen mit Dox-induzierbarer ERG Expression unter Zugabe von Sorafenib.** Gemessen wurde die Proliferationsrate als optische Dichte bei 450 nm, mittels WST-Test. Zum Zeitpunkt  $t=-24$  ist eine 96 Well Platte mit Zellen ohne Dox-Zugabe und K562-Zellen, die bereits 48h mit Dox induziert wurden, beladen worden. Nach weiteren 24h (also  $t=0h$ ) erfolgte die Zugabe von Sorafenib ( $10 \mu M$ ). Gemessen wurde die Proliferation zu den Zeitpunkten -24h (als Ladekontrolle), 0h, 24h, 48h und 72h. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen K562 pTRE-ERG3 Klons als Mittelwert mit Standardabweichung aus 5-fach Ansätzen für die Kontrolle ohne Zugabe von Sorafenib (durchgezogene Linie) sowie für die Versuchsgruppe unter Behandlung mit  $10 \mu M$  Sorafenib (gestrichelte Linie) mit (graue Linien) und ohne (schwarze Linien) Induktion der ERG-Expression durch Dox-Zugabe. Es konnte für den Zeitpunkt 72 h nach Beginn der Behandlung mit Sorafenib ein signifikanter Proliferationsvorteil der ERG exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Die Signifikanz wurde mittels Wilcoxon Rangsummentest berechnet. \* :  $p < 0,05$ .

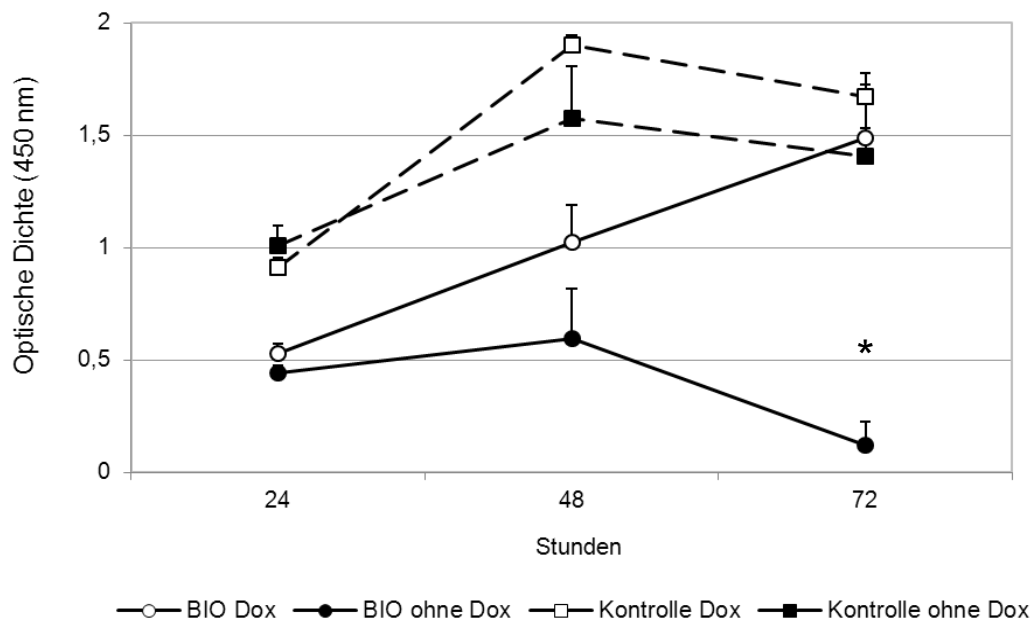
Ein weiterer Signalweg, für den mittels ChIP-chip eine Anreicherung innerhalb der ERG-Targetgene gezeigt wurde, ist der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg. Ferner wurde die Promotor-ChIP Anreicherung für einige WNT-Gene (*WNT2*, *WNT9A*, *WNT11*, *FZD7*, *CCND1*, *DAAM1*) validiert und es konnte gezeigt werden, dass ERG die Expression von *WNT11* beeinflusst. Um die funktionelle Bedeutung des ERG-Einflusses auf den



## Ergebnisse

WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg weiter zu analysieren, wurde der Effekt des Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) Inhibitors BIO auf die Proliferation der ERG-induzierten Zellen untersucht. Die Glykogensynthase-Kinase nimmt eine zentrale Rolle im WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg ein und hat Einfluss auf zelluläre Proliferation, Differenzierung und Überleben [105]. Des Weiteren werden GSK-3 $\beta$  Inhibitoren therapeutisch eingesetzt, da sie die Onkogenese inhibieren [106]. Das Molekül BIO aktiviert den kanonischen WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg [107] und inhibiert die Proliferation leukämischer Zellen [108].

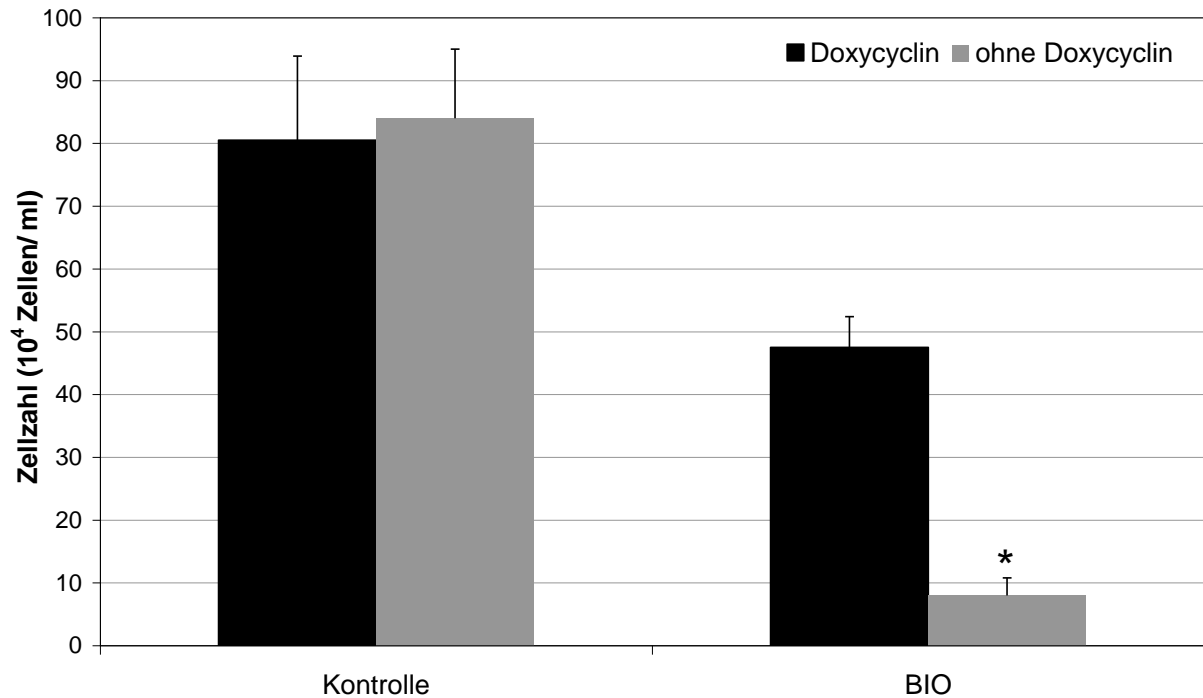
Nach Zugabe von BIO (1,5  $\mu$ M) zeigten die induzierten Zellen einen signifikanten Proliferationsvorteil gegenüber der Kontrolle (Abbildung 20). Diese Ergebnisse konnten für mehrere Klone wiederholt gezeigt werden und ließen sich auch durch Zellzählung nach Trypanblaufärbung bestätigen (Abbildung 21). Dies lässt vermuten, dass ERG Einfluss auf den WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg ausübt und so die proliferationshemmende Wirkung von BIO in den Zellen mit *ERG*-Expression nicht so potent ist.



**Abb. 20: WST-Test zum Resistenzverhalten *ERG*-exprimierender Zellen gegenüber BIO.** Gemessen wurde die Proliferationsrate als optische Dichte bei 450 nm, mittels WST-Test 24, 48 und 72 h nach Zugabe des GSK-3 $\beta$  Inhibitors BIO (1,5  $\mu$ M). Dargestellt sind die Ergebnisse eines K562 pTRE-*ERG3* Klons mit und ohne Induktion der *ERG*-Expression durch Doxzugabe (mit Dox weißer Punkt bzw. weißes Quadrat, ohne Dox schwarz) sowie mit und ohne Zugabe von BIO (mit BIO – Kreis, ohne BIO – Quadrat). Die Kontrollen ohne Zugabe von BIO unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Proliferation. Für die *ERG*-induzierten Zellen konnte 72 h nach Zugabe von BIO ein signifikanter Proliferationsvorteil gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (der

## Ergebnisse

Proliferationsvorteil wurde an 3 Klonen gemessen und bestätigt) als Mittelwert mit Standardabweichung aus 5-fach Ansätzen. Die Signifikanz wurde mittels Wilcoxon Rangsummentest berechnet. \* :  $p < 0,05$ .



**Abb.21: Ergebnisse der Zellzahlbestimmung nach Zugabe von BIO.** Dargestellt ist die Zellzahl in  $10^4$  Zellen/ml 72 h nach Zugabe von BIO ( $1,5 \mu\text{M}$ ). Dargestellt sind die Ergebnisse eines K562 pTRE-*ERG3* Klon mit (graue Balken) und ohne (schwarze Balken) Induktion der *ERG*-Expression durch Dox sowie mit und ohne Zugabe von BIO. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis als Mittelwert mit Standardabweichung aus 2-fach Ansätzen. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's T-Test bestimmt. \* :  $p < 0,05$  (Signifikanz +Dox gegenüber -Dox).

## 5. Diskussion

### 5.1 ERG als Transkriptionsaktivator des nicht kanonischen WNT-Gens *WNT11*

Ziel dieser Promotion war es, Zielgene des TFs ERG zu identifizieren, da bisher nur einige wenige in der Literatur beschrieben worden sind und eine Identifizierung weiterer zu einem besseren Verständnis der Beteiligung von ERG an der Leukämogenese und der Entwicklung optimierter Therapien beitragen könnte. Erstmals konnten Rainis *et al.* durch Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender qrt-PCR zeigen, dass ERG die Promotoren von *GP1B* und *GP1BB* bindet und für *GP1B* konnte eine transkriptionsaktivierende Funktion durch ERG gezeigt werden [52]. Die Glykoproteine kodieren die Untereinheiten eines Rezeptors auf der Oberfläche reifer Thrombozyten, der für die Bindung des von Willebrand Faktors während der Hämostase notwendig ist. Außerdem konnten sie zeigen, dass ERG das *Enhancerelement* des TFs *SCL (TAL1)* bindet, welcher die Expression promegakaryopoetischer Gene reguliert. Dies unterstützt bisherige Resultate, dass ERG promegakaryopoetische Funktionen ausübt [53, 109]. Analog konnte durch unsere ChIP-chip Versuche eine Anreicherung des *GP1BB* Promotors in der Jurkatzelllinie gezeigt werden, die sich auch durch qrt-PCR bestätigen ließ.

Weiterhin konnte durch die von uns durchgeführten ChIP-chip Versuche sowohl in der Zelllinie Jurkat als auch in 3 primären Leukämieproben eine Anreicherung des *WNT11* Promotors gezeigt werden. Diese Anreicherung konnte mittels qrt-PCR in 5 der 6 primären Leukämieproben und der Jurkatzelllinie bestätigt werden, so dass eine Bindung des *WNT11* Promotors durch ERG bestätigt worden ist. Um zu eruieren, ob ERG als Transkriptionsaktivator oder –repressor dieses Gens fungiert, wurde die *ERG* Expression in KG1 Zellen durch siRNA vermindert und in K562 Zellen durch Transfektion mit einem Expressionsplasmid induziert. Es konnte eine verminderte *WNT11* Expression nach *knock down* von *ERG* gemessen werden und eine erhöhte bzw. neu aufgetretene Expression von *WNT11* in Zellen der Linie K562 nach Induktion der *ERG*-Expression. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ERG ein direkter Transkriptionsaktivator von *WNT11* ist. Demnach könnte eine verstärkte Expression der *WNT11* mRNA eine Folge einer aberranten *ERG*-Expression sein.

## Diskussion

Bisherige Studien an avianen Stammzellen und Zelllinien konnten zeigen, dass die Expression von *WNT11* eine notwendige Voraussetzung für die Differenzierung mesodermaler Stammzellen in hämatopoetische, besonders erythroide Progenitoren, und somit einer funktionierenden Hämatopoese ist [110]. Damit spielt *WNT11*, genauso wie *ERG*, eine Rolle in der frühen Hämatopoese.

Weiterhin konnte eine Assoziation der *WNT11*-Expression mit Prostatakarzinomen gezeigt werden. So zeigten die hormonunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien und high-grade Prostatatumoren eine erhöhte Expression von *WNT11* und der Hormonentzug führt in hormonabhängigen Zelllinien zu einer vermehrten Expression von *WNT11* [111]. Die Expression von *WNT11* führte zu einem hormonunabhängigen Wachstum in Prostatakarzinomen, was einen ungünstigen prognostischen Faktor darstellt. Eine weitere Arbeit zeigte, dass eine ektope Expression von *WNT11* zu einer neuroendokrinen Differenzierung der Prostatakarzinomzellen führt und somit prognostisch ungünstig ist [112]. Dies führt zu einer Progression des Tumors mit vermehrtem Zellüberleben und verstärkter Migration und Invasion der tumorösen Zellen. Ähnliches konnte auch für Mammakarzinomzellen gezeigt werden, bei denen eine vermehrte *WNT11*-Expression die Apoptoseraten signifikant reduziert [113].

Demnach erfüllen *ERG* und *WNT11* ähnliche Funktionen in der frühen Hämatopoese und eine hohe Expression dieser Gene gilt als ungünstiger prognostischer Faktor bei malignen Erkrankungen. Allerdings liegen bisher keine Studien zur Expression von *WNT11* in akuten Leukämien vor.

## **5.2 ERG-vermittelte Regulation von Kinasekaskaden und kanonischen Signalwegen**

Zur Identifizierung *ERG*-modulierter Signalwege sind die angereicherten Genlisten bioinformatisch analysiert worden. Die bioinformatische Auswertung mittels DAVID zeigte eine Anreicherung für intrazelluläre Signalwege. Im Jurkat ChIP-chip waren der *WNT*/ $\beta$ -Catenin Signalweg und *NANOG* Signalweg angereichert ( $p < 0,05$ ), die beide Funktionen in der Stammzellpluripotenz ausüben. In den primären Leukämieproben waren Signalwege wie *WNT*/ $\beta$ -Catenin, *PI3K*/*AKT*, *TNFR1*, *p53* sowie Interferon und Interleukin Signalwege angereichert, die zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren und diese Funktionen hauptsächlich über Kinasekaskaden vermitteln [114, 115].

## Diskussion

Die während der Leukämogenese ablaufenden zellulären Prozesse sind denen der normalen Hämatopoese ähnlich, allerdings ist das fragile Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose gestört. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass eine aberrante Aktivierung jener Signalwege, die diese Prozesse regulieren, im Zusammenhang mit Leukämien beschrieben worden ist.

So ist die PI3-Kinase physiologisch an der erythroiden Proliferation und dem Erhalt normaler erythroider Progenitoren beteiligt und eine abnorme Aktivierung der PI3-Kinase ist in 50% aller AMLs nachzuweisen [116].

Der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg ist Bestandteil vieler der im ERG ChIP-chip angereicherten Signalwege (PI3K/AKT, TNFR1, CNTF, Interferon und Interleukin). Er ist an der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen aller Linien beteiligt [117] und seine aberrante Aktivierung kann in mehr als 50% aller akuten Leukämien nachgewiesen werden [114].

WNT-Proteine sind in der Embryogenese wichtig für die zelluläre Differenzierung und bei Erwachsenen an der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulationen beteiligt [118]. Eine aberrante Expression von Genen des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs, beruhend auf Mutationen, konnte bereits in Patienten mit CML, AML, ALL und Multiplem Myelom nachgewiesen werden [18]. Außerdem konnte in Patienten mit ALL eine Hypermethylierung der Promotoren spezifischer WNT-Inhibitoren gezeigt werden, die zu einer Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs führte. Diese Patienten zeigten, ähnlich den Patienten mit einer erhöhten *ERG*-Expression, ein vermindertes rezidivfreies und Gesamtüberleben [119]. Auch das nicht kanonische Gen *WNT5a* war in 5 von 11 getesteten AML Zelllinien und 50 % aller primären AML-Proben hypermethyliert [120].

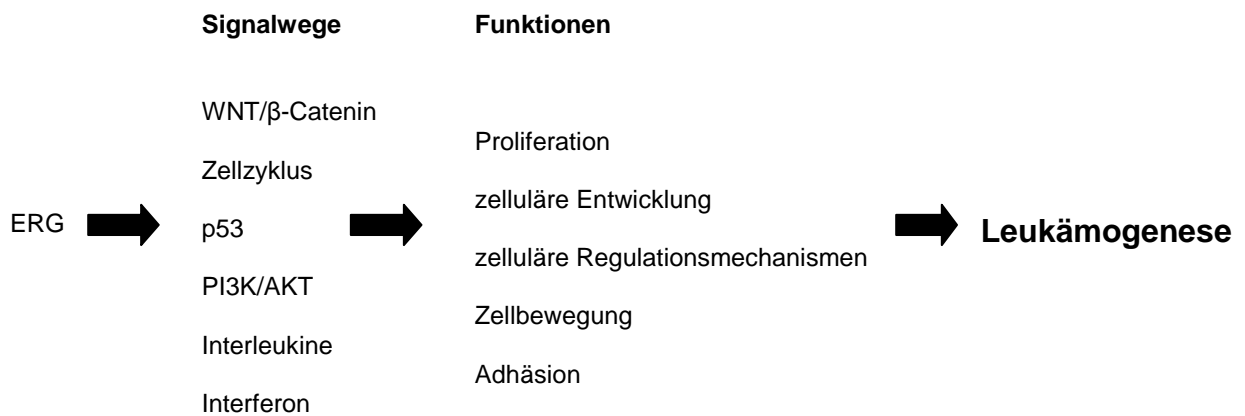
Analog zu den hier durchgeführten ChIP-chip Versuchen, in denen eine Anreicherung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs und die Bindung von ERG an WNT-Gene wie *WNT2*, *WNT11*, *FZD7*, *DAAM1* und *CCND1* gezeigt werden konnte, wurde kürzlich durch Genexpressionsanalysen an Prostatakarzinomzelllinien gezeigt, dass viele WNT-Gene mit *ERG* koreguliert sind [99]. Außerdem wurde durch Chromatin-Immunopräzipitation gezeigt, dass ERG den *FZD4* Promotor bindet und somit eine Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs bewirkt.

Demnach konnte durch unsere ChIP-chip Versuche der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg als ein Ziel der Regulation durch ERG bestätigt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da diesem Signalweg Funktionen in der Embryogenese und

## Diskussion

Stammzellentwicklung zugesprochen werden, aber auch, weil ein deregulierter WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg zur Entstehung maligner Erkrankungen beiträgt [18, 118]. Dies korreliert mit physiologischen und pathologischen Funktionen von ERG und es ist wahrscheinlich, dass ERG zumindest einen Teil seiner Funktionen über diesen Weg ausübt.

Für die übrigen angereicherten Signalwege ist bisher in der Literatur kein Zusammenhang mit der *ERG*-Expression bzw. eine Regulation durch ERG beschrieben. Allerdings werden durch diese Signalwege zelluläre Prozesse wie Proliferation, Entwicklung, Zellzyklus und Apoptose gesteuert. Diese Prozesse sind es jedoch, die einem empfindlichen Gleichgewicht unterliegen und fehlreguliert zur Leukämogenese beitragen (Abbildung 22). Es ist denkbar, dass eine vermehrte Expression von *ERG*, das in seiner physiologischen Funktion für die Aufrechterhaltung eines hämatopoetischen Stammzellpools notwendig ist [49, 54], über die aberrante Aktivierung eben jener Signalwege eine vermehrte Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und einen Differenzierungsstopp derselbigen bewirkt und somit die Leukämogenese mit auslöst oder zumindest fördert.



**Abb. 22: Schematische Darstellung der ERG-vermittelten Leukämogenese.** Bioinformatische Analysen der ChIP-chip Daten lieferten eine Anreicherung der Signalwege WNT/ $\beta$ -Catenin, Zellzyklus, p53, PI3K/AKT, Interleukin und Interferon. Dementsprechend waren unter den ermittelten ERG-Targetgenen zelluläre Funktionen wie Proliferation, Entwicklung, Regulationsmechanismen, Zellbewegung und Adhäsion angereichert, die durch eben diese Signalwege reguliert werden. Diese Funktionen unterliegen jedoch einem fragilen Gleichgewicht und sind in ihrem Zusammenwirken oft im Rahmen der Leukämogenese gestört.

### 5.3 *ERG*-Expression bewirkt einen Proliferationsvorteil gegenüber Kinaseinhibitoren

ChIP-chip Versuche an leukämischen Zelllinien und primären Leukämieproben zeigten eine Anreicherung für Gene der WNT/ $\beta$ -Catenin, PI3K/AKT, HMGB1, TNFR1, CNTF und Interferon Signalwege, denen gemein ist, dass sie ihre Signaltransduktion zum Teil über Kinasen ausüben und wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren. Um zu untersuchen, welche Auswirkungen dies auf das Proliferationsverhalten *ERG* exprimierender leukämischer Zellen hat, wurde die Proliferation dieser Zellen mittels WST-Test gemessen und der Effekt von BIO, einem Inhibitor der GSK-3 $\beta$ , Sorafenib, einem Multikinaseinhibitor, und verschiedenen Kinaseinhibitoren des MAPK Signalwegs untersucht.

Ein zentrales Molekül des klassischen WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs ist das  $\beta$ -Catenin, das als Transkriptionsaktivator fungiert [121]. In Abwesenheit von WNT Liganden wird die Konzentration an  $\beta$ -Catenin dadurch gering gehalten, dass es von einem Komplex aus Axin, GSK-3 $\beta$  und APC gebunden und durch GSK-3 $\beta$  phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung wird  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert und in Proteasomen abgebaut. Bindet WNT allerdings an den Frizzled-Rezeptor, so wird das Protein Dishevelled phosphoryliert und verhindert somit die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, das nicht mehr abgebaut wird und im Zellkern als Koaktivator der TF TCF/LEF fungieren kann. Es kommt zur Transkription mitogener Gene wie Zyklin D1 und c-MYC, so dass ein deregulierter WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg zu vermehrter Zellproliferation und somit Kanzerogenese beiträgt.

Da WNT11 ein nicht kanonisches WNT-Protein ist, inhibiert es die  $\beta$ -Catenin abhängige Transkription in murinen embryonischen Stammzellen und die Aktivierung von LEF1 durch  $\beta$ -Catenin [122].

BIO inhibiert GSK-3 $\beta$  und sorgt für die Aufrechterhaltung einer normalen embryonischen Stammzellpopulation [123]. Im Gegensatz dazu inhibiert es durch Apoptoseinduktion eine Proliferation leukämischer Zellen, so dass es als spezifische Therapieoption bei Leukämien interessant erscheint, da es gesunde Stammzellen verschont und leukämische Zellen tötet [108]. Die aus der GSK-3 $\beta$  Inhibition folgende Aktivierung von  $\beta$ -Catenin stellt somit einen Gegenspieler zu WNT11 dar und wurde hier untersucht (Abbildung 23). Dabei konnte eine Resistenz der *ERG* exprimierenden Zellen gegenüber dem proliferationshemmenden Effekt von BIO festgestellt werden.

## Diskussion

Dies könnte auf einer ERG/WNT11-abhängigen Antagonisierung der BIO-induzierten Aktivierung von  $\beta$ -Catenin beruhen. Somit könnte sich GSK-3 $\beta$  Inhibitoren als insuffiziente Therapieoption bei jenen Leukämien mit hoher ERG-Expression erweisen, auf Grund einer intrinsischen ERG-vermittelten Resistenz gegenüber dieser Substanzgruppe.

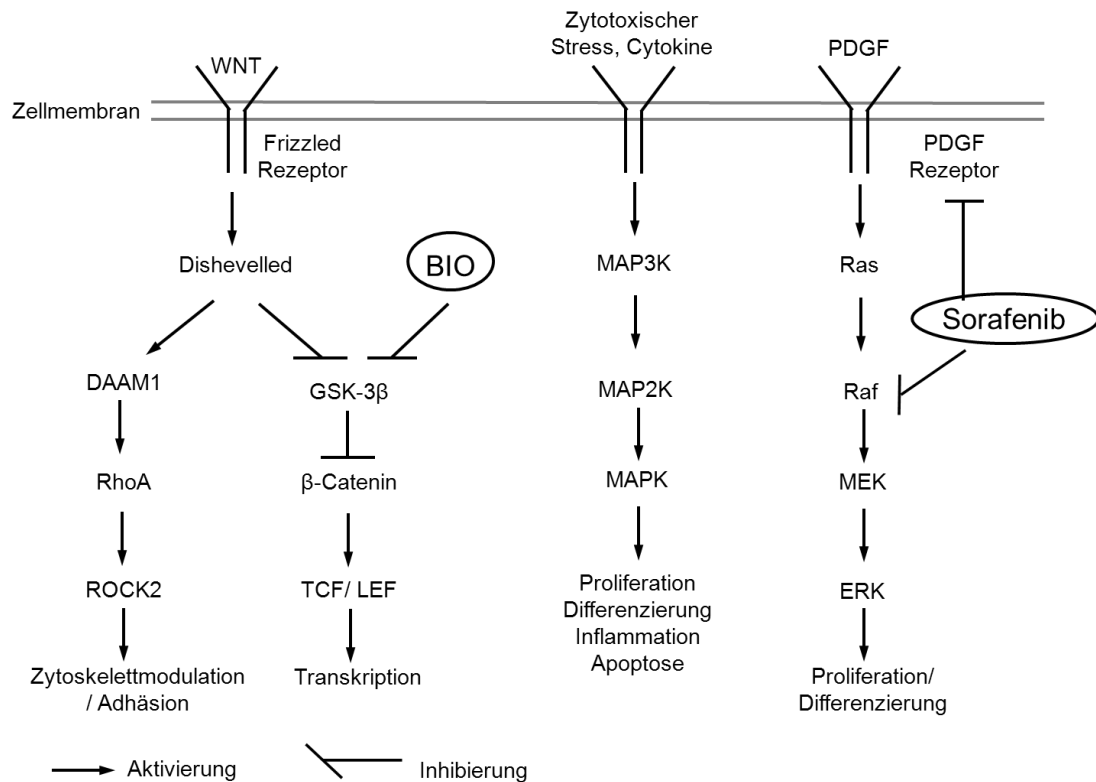
Die anderen getesteten Kinaseninhibitoren wirken auf spezifische Kinasen des MAPK Signalwegs. Die MAPK Signalwege stellen eine Kaskade von aufeinander folgenden Phosphorylierungen und somit Aktivierungen der folgenden Kinasen dar. Es gibt drei Gruppen von MAPK Signalwegen: den Raf/ MEK/ ERK Signalweg, der vor allem durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird, sowie die stress-aktivierten Signalwege, die zur Aktivierung der Kinasen p38 und JNK führen. Am Ende dieser Phosphorylierungskaskaden steht die Aktivierung von TF, die zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern [114]. Da es bei malignen hämatologischen Erkrankungen zu einer Aktivierung dieser Signalkaskaden kommen kann, wurden bereits verschiedene MAPK-Inhibitoren auf ihre antiproliferativen Effekte auf leukämische Zelllinien untersucht [100, 101]. Hier konnte ein additiver Effekt der Kombination von klassischen Chemotherapeutika mit MAPK-Inhibitoren auf die Proliferationshemmung festgestellt werden. Die getesteten Inhibitoren wirken vor allem auf die Kinasen MEK1 und 2 (SL327, U01269) sowie JNK1-3 (SP600125) und p38 (SB203580). In dieser Arbeit konnte für alle 4 Kinaseinhibitoren der in der Literatur beschriebene additive Effekt auf die Proliferationshemmung gezeigt werden. Allerdings ließ sich kein Unterschied zwischen ERG-induzierten und nicht induzierten Zellen zeigen, so dass diese Kinasen wahrscheinlich kein Haupttarget der ERG-Regulation darstellen.

Eine weitere getestete Substanz ist Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, der für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms und des nicht rezidierbaren hepatozellulären Karzinoms zugelassen ist. Neben Wachstumsfaktorrezeptoren wie VEGFR und PDGFR inhibiert es c-Kit, FLT3 und Raf und somit den MAPK Signalweg (Abbildung 23) [104]. Da Mutationen von *Ras/Raf* sowie *FLT3* und *c-Kit* in akuten Leukämien eine Rolle spielen [17], wurde Sorafenib bereits erfolgreich in *FLT3-ITD* positiven AMLs und Rezidivbehandlung der AML eingesetzt [102, 103]. In unseren Versuchen zeigte die Behandlung mit Sorafenib einen reproduzierbaren Proliferationsvorteil der ERG exprimierenden Zellen im WST-Test. Dies könnte auf einer ERG-vermittelten vermehrten Expression von Kinasen des MAPK Signalwegs beruhen,



## Diskussion

die somit die proliferationshemmende Wirkung von Sorafenib zumindest teilweise aufhebt. Daher könnte sich auch Sorafenib als Therapieoption der akuten Leukämien mit hoher *ERG*-Expression als insuffizient erweisen oder höhere Dosen des Medikaments nötig machen.



**Abb. 23: Schematische Darstellung mittels ChIP-chip angereicherter Signalwege.** Gezeigt ist der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg mit seinem kanonischen Anteil über GSK-3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin sowie der über DAAM1 vermittelte Anteil, für das eine Anreicherung des Promotors mittels qrt-PCR in allen 6 primären Leukämieproben gezeigt werden konnte. Dargestellt ist weiterhin der durch Stress und Zytokine vermittelte Schenkel des MAPK Signalwegs sowie der Anteil mit Aktivierung durch Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren sowie die Zielmoleküle der Kinaseinhibitoren BIO und Sorafenib.

## 5.4 Regulation von Funktionen der Stammzellnische durch ERG

Mittels ChIP-chip konnten in der Zelllinie Jurkat und in den primären Leukämieproben Funktionen wie Wachstum und Proliferation, Differenzierung sowie zelluläre Adhäsion, Zellbewegung und –morphologie als durch ERG moduliert identifiziert werden. Dies suggeriert eine Bedeutung von ERG in der Regulation des Proliferations-/Differenzierungsgleichgewichts sowie von Adhäsionsmolekülen und Molekülen des Zytoskeletts.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ERG modulierenden Einfluss auf die zelluläre Proliferation ausübt. Ijijn *et al.* analysierten die Genexpressionsdaten von 410

## Diskussion

Prostataresektaten auf *ERG* koregulierte Gene [124]. Nach bioinformatischer Auswertung dieser Datensätze konnten sie eine Anreicherung von Genen mit Funktion in der Organogenese und zellulärem Wachstum feststellen. Dies passt zu den durch uns gefundenen angereicherten Funktionen der zellulären Entwicklung und Zellwachstum und –proliferation. Des Weiteren konnten auch sie eine Anreicherung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs zeigen.

Eine Beteiligung ERGs an der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen konnte bereits durch Rainis *et al.* und Stankiewicz *et al.* demonstriert werden. Sie zeigten, dass *ERG* in K562 Zellen und murinen hepatischen Vorläuferzellen die Differenzierung zu megakaryopoetischen Zellen fördert [52, 53]. Außerdem ist *ERG* notwendig für das Fortbestehen eines hämatopoetischen Stammzellpools [49, 54].

Ferner konnte *ERG* bereits mit zellulärer Migration und Genen der zellulären Adhäsion in Verbindung gebracht werden. Es wurde gezeigt, dass *ERG* in migrierenden Zellen der Neuralleiste während der Embryonalentwicklung der Maus exprimiert ist [125]. Des Weiteren ist *ERG* im Rahmen der Angiogenese mit *VE-Cadherin*, einem Adhäsionsprotein, koexprimiert [50].

Schließlich konnte gezeigt werden, dass *ERG* an Vorgängen der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt ist, ein Vorgang, der durch verminderte Zelladhäsion und vermehrte Zellmigration gekennzeichnet ist und dem eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung von Karzinomen zugesprochen wird. Ein *knock down* von *ERG* führt zur vermehrten Expression von *E-Cadherin* und  $\beta$ -*Integrin* und zu sehr adhären Zellen [99]. Überexpression von *ERG* wiederum führt zum Verlust der *E-Cadherin* Expression, als Kennzeichen einer EMT.

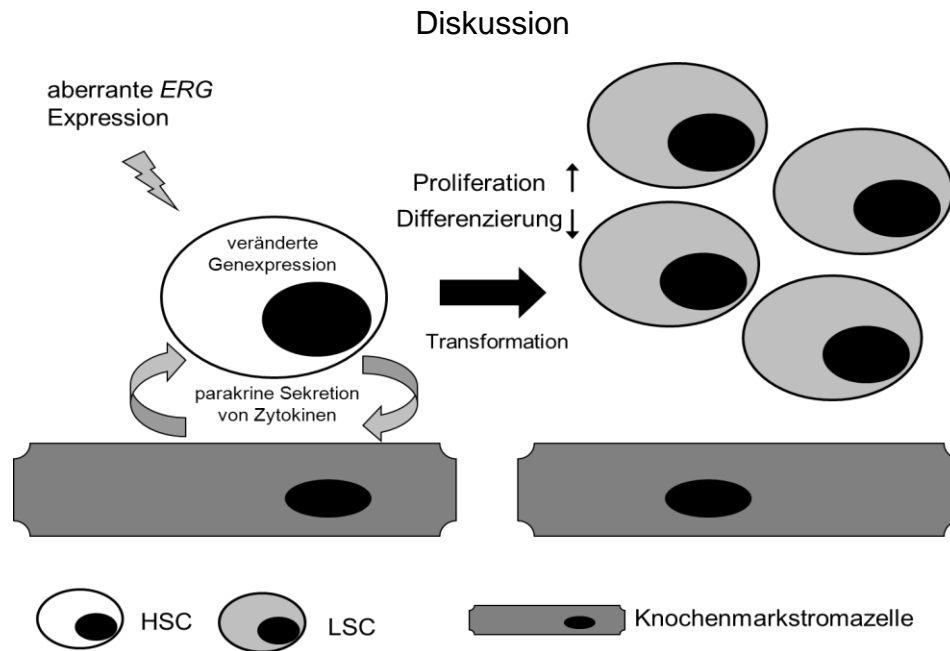
Die angereicherten Funktionen wie Proliferation und Differenzierung auf der einen Seite sowie Adhäsion und Zellbewegung auf der anderen sind Bestandteile der Vorgänge in der Stammzellnische des Knochenmarks. Ebenso spielen viele der angereicherten Zytokine und Signalwege eine Rolle im Rahmen des Mikromilieus der Stammzellnische. Die Stammzellnische ist ein Kompartiment in mehrzelligen Organismen, welches die HSC enthält und anatomische sowie zelluläre und nicht-zelluläre Strukturen für die Aufrechterhaltung eines Stammzellpools bereit stellt [25]. Die Adhäsion zwischen Stammzellen und Stromazellen sorgt für die notwendige räumliche Nähe für die parakrine Wirkung von Zytokinen innerhalb der Stammzellnische, die wiederum die Proliferation und Differenzierung der HSC regulieren. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Bildung hämatopoetischer Zellen stets in ausreichendem Maße

## Diskussion

vonstatten geht, sich der Stammzellpool aber nicht erschöpft. Eine Störung in diesem empfindlichen Gleichgewicht, die z.B. die Differenzierung inhibiert und Proliferation fördert, träge somit zur Bildung vieler unreifer Zellen bei und begünstige die Leukämogenese. Deshalb wird der Stammzellnische zum einen eine direkte Beteiligung an der Leukämogenese zugesprochen, zum anderen bewirkt die räumliche Nähe zu den Stromazellen einen Schutz der leukämischen Zellen vor den Effekten einer antineoplastischen Therapie [24].

Die Vorgänge innerhalb der Stammzellnische sind noch größtenteils unbekannt, jedoch lässt sich sagen, dass für die Vermittlung der Effekte in der Stammzellnische eine Adhäsion zwischen HSC und Stromazellen notwendig ist sowie eine Sekretion von Zytokinen und parakrin wirksamen Substanzen. Diese bewirken wiederum eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege, wie z.B. WNT/ $\beta$ -Catenin, PI3K/AKT und Ras/MEK/ERK Signalweg [126, 127].

ChIP-chip Analysen des TF ERG an einer leukämischen Zelllinie sowie primären Leukämieproben zeigten Anreicherungen für zelluläre Signalwege wie WNT/ $\beta$ -Catenin, PI3K/AKT, Interferon und Interleukin Signalwege und Funktionen der Zellmigration und -adhäsion. Eine mögliche Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass ERG die Interaktionen zwischen HSCs und der Stammzellnische reguliert und somit bei aberranter Expression die Leukämogenese und Chemoresistenz leukämischer Stammzellen unterstützt (Abbildung 24).



**Abb. 24: Schematische Darstellung der möglichen ERG-vermittelten Einflüsse auf das Mikromilieu der Stammzellnische.** Eine aberrante *ERG*-Expression bewirkt ein verändertes Genexpressionsmuster in den betroffenen Zellen, wodurch die Proliferation dieser gesteigert und die Differenzierung inhibiert wird. Ferner kommt es zur parakrinen Sekretion von Zytokinen und z.B. WNT-Molekülen und damit einhergehend zu verändertem Proliferations- und Migrationsverhalten benachbarter Stammzellen. Diese Vorgänge führen in ihrer Gesamtheit zu einer Transformation der HSC zur leukämischen Stammzelle und zur Proliferation des leukämischen Zellklons.

## 5.5 Starke Heterogenität der ChIP-chip Versuche

Um Targetgene des TFs ERG zu identifizieren wurde ein genomweites Screening in Form von ChIP-chip Versuchen an primären leukämischen Blasten (5 AML und 1 T-ALL) und Leukämiezelllinien (Jurkat und HL60) durchgeführt. Dabei fungierte die Zelllinie HL60 auf Grund fehlender *ERG*-Expression als Negativkontrolle.

Jedoch zeigten die Ergebnisse der ChIP-chip Versuche nur geringe Übereinstimmungen untereinander. So gibt es kein Gen, das in allen 7 Proben angereichert war und auch keines, das allen AML Proben gemeinsam war. Die durchschnittliche Übereinstimmung der primären Leukämieproben untereinander lag bei etwa 10%, die der Leukämieproben mit der Jurkatzelllinie bei durchschnittlich 2%. Es gab lediglich 23 Gene, die in mindestens 3 der primären Leukämieproben angereichert waren und es gab 11 gemeinsame Gene zwischen dem Jurkat ChIP-chip und mindestens zwei der 6 Leukämieproben. Des Weiteren konnte durch Vergleich der Genlisten mit der HL60 Negativkontrolle ein Anteil an falsch positiven Ergebnissen von 0,8 – 10,9 % gefunden werden.

## Diskussion

Diese Zahlen lassen auf eine geringe Spezifität der Ergebnisse, mit einem großen Anteil an Hintergrundrauschen, schließen. Allerdings zeigte eine umfangreiche Analyse von Waldminghaus *et al.* zu ChIP-chip Ergebnissen, dass diese stets einen großen Anteil an Hintergrundrauschen, resultierend in falsch positiven Ergebnissen, aufweisen [128]. Sie optimierten das ChIP-chip Protokoll durch intensivierete Waschschrirte, RNase-Verdau und Ausschluss von repetitiven Sequenzen bei der Auswertung der Hybridisierungsdaten um dies zu minimieren. Mit diesem optimierten Protokoll wiederholten sie einen durch Wade *et al.* publizierten ChIP-chip Versuch des heat shock  $\sigma^{32}$  factors in E.coli Zellen und konnten nur knapp 50 % der bisher gefundenen Gene bestätigen.

Zwei unabhängige Studien zu Bindungsstellen des Estrogen Rezeptors auf Chromosom 17 an MCF-7 Zellen zeigten nur eine Übereinstimmung von 50 % [129] und Analysen zum Bindungsverhalten des RNA Polymerase II Koaktivators Mediator lieferten sehr unterschiedliche Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen [111, 130, 131].

Diese Arbeiten zeigen, dass es in ChIP-chip Versuchen stets einen hohen Anteil an falsch positiven Ergebnissen zwischen etwa 30 – 50 % gibt und dass 2 gleichartig durchgeführte ChIP-chip Versuche nur etwa 50 % Übereinstimmung aufweisen. Im Vergleich zu den aufgeführten Arbeiten weisen die ChIP-chip Ergebnisse an den primären Leukämieproben mit einer Übereinstimmung von etwa 10 % eine geringere Effizienz auf. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass es sich hierbei um primäres Patientenmaterial einer genetisch sehr heterogenen Erkrankung handelt und nicht eine unter vergleichbaren Bedingungen kultivierte Zelllinie, so dass die Bindung von ERG an die Promotoren durch andere interindividuelle Faktoren beeinflusst wird.

Ein Vergleich der Ergebnisse der primären Leukämieproben mit dem Jurkat ChIP-chip ist auf Grund der Unterschiede der Methodik von Chromatin-Immunopräzipitation und Hybridisierung sowie im Arraydesign und bei der Auswertung der statistischen Daten nicht praktikabel, da für die Patientenproben aus Kostengründen ein anderes Array und Protokoll gewählt wurde. Schließlich bestehen Unterschiede in der Genexpression und Genregulation zwischen den primären Leukämieproben und dem sehr artifiziellen System der Zelllinie.

Auf Grund dieser Ergebnisse und ähnlich hohem Hintergrundrauschen in anderen ChIP-chip Arbeiten ist die Verwendung geeigneter Kontrollen in einem ChIP-chip Versuch unabdingbar. Zusätzlich zu den Hybridisierungskontrollen, die in dieser Arbeit aus Input als Kontrolle für die Hybridisierung und Statistik und unspezifischem IgG für

## Diskussion

die statistische Auswertung bestanden, sollte man unbedingt eine von der Hybridisierung unabhängige Kontrolle mitführen [128]. Diese kann z.B. aus einer Probe bestehen, die das zu untersuchende Protein nicht aufweist. Jegliche Anreicherung in dieser Probe muss als falsch positives Resultat gelten. Diese Bedingung wurde in dieser Versuchsreihe durch das Mitführen der HL60 Kontrolle gewährleistet. Alle weiteren Ergebnisse wurden nach Subtraktion dieser Kontrolle generiert bzw. im Vergleich zu dieser betrachtet.

Abschließend muss gesagt werden, dass die ChIP-chip Methodik trotz aller Sorgfalt bei der Auswahl geeigneter Kontrollen stets nur als Screeningverfahren gesehen werden sollte, das stets auch falsch positive Daten liefert. Es dient vor allem dazu einen globalen Überblick über regulierte Funktionen und Signalwege zu generieren, die durch unabhängige Verfahren validiert werden sollten. Dies ist in dieser Arbeit durch die Untersuchung des Einflusses der Modulation der *ERG*-Expression auf die Expression von Targetgenen sowie die Versuche zum Resistenzverhalten gegenüber Kinaseinhibitoren erfolgt.

### **5.6 Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse**

ChIP-chip Versuche an leukämischen Zelllinien und primären Leukämieproben enthüllten *WNT11* als ein Targetgen des TFs ERG und konnten eine transkriptionsaktivierende Funktion von ERG auf dieses Target zeigen.

Des Weiteren zeigte sich eine Anreicherung intrazellulärer Signalwege wie WNT/ $\beta$ -Catenin, PI3K/AKT, HMGB1, TNFR1, CNTF und Interferon Signalwege. Dies passt zu angereicherten biologischen Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration, die durch diese Signalwege vermittelt werden. Eben jene Funktionen sind nach der „2-hit-Hypothese“ an der Leukämogenese, die auf einem Differenzierungsblock und der gesteigerten Proliferation einer oder weniger hämatopoetischer Vorläuferzellen beruht, beteiligt [16].

Ferner wird dem Mikromilieu der Stammzellnische eine Bedeutung bei der Leukämogenese und Vermittlung von Chemoresistenzmechanismen zugeschrieben. Durch parakrine Sekretion von Zytokinen und der räumlichen Nähe zu den Knochenmarkstromazellen wird im Rahmen von akuten Leukämien ebenso die Proliferation gefördert und die Differenzierung gehemmt. Die Stromazellen wiederum könnten einen gewissen Schutz der leukämischen Blasten vor den Chemotherapeutika vermitteln oder ein Reservoir für die minimale Resterkrankung darstellen, von der ein

## Diskussion

Rezidiv auszugehen vermag. Somit könnte ERG über die Modulation des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung sowie der Modulation des Milieus in der Stammzellnische die Leukämogenese fördern.

Mittels Zellviabilitätsassays (WST-1) konnte eine Resistenz ERG exprimierender Zellen gegenüber den Kinaseinhibitoren BIO und Sorafenib gezeigt werden, die sich demnach als insuffizient in der Therapie der akuten Leukämie mit hoher ERG-Expression erweisen könnten (Abbildung 25).

ChIP-chip	Bioinformatik <i>DAVID, IPA</i>	Validierung von Zielgenen <i>real-time PCR</i> <i>RT-PCR</i>	Funktion Resistenzverhalten ERG exprimierender Zellen (WST-1 Assay)
Jurkat	NANOG		<u>sensibel:</u>
	WNT/β-Catenin	WNT11	AraC
Primäre Leukämieproben	Zellzyklus	DAAM1	SB203580
	p53		SL327
	PI3K/AKT		SP600125
	Interleukine		U0126
	Interferon		<u>resistent:</u>
			BIO
			Sorafenib

**Abb. 25: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse.** Mittels bioinformatischer Analyse konnten in der Jurkatzelllinie und den primären Leukämieproben mehrere Signalwege als angereichert identifiziert werden. Darunter war der WNT/β-Catenin Signalweg sowohl in der Zelllinie als auch in den primären Leukämieproben angereichert. Zu den validierten Zielgenen gehörte *WNT11*, das sowohl im Jurkat ChIP-chip als auch in den primären Leukämieproben angereichert war, sowie *DAAM1*, das in allen 6 primären Leukämieproben mittels qrt-PCR validiert werden konnte und 17 weitere Gene, die im Jurkat ChIP-chip mittels qrt-PCR validiert worden sind.

Weiterhin zeigten ERG exprimierende Zellen eine Resistenz gegenüber den Kinaseinhibitoren BIO und Sorafenib im WST-1 Test, jedoch nicht gegenüber AraC und 4 weiteren Inhibitoren des MAPK Signalwegs.

Die im Rahmen dieser Promotion erzielten Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass ERG durch die Modulation intrazellulärer Signalwege und Kinasekaskaden ursächlich an der Leukämogenese beteiligt sein könnte. Ferner scheint ERG über den Einfluss auf diese Kinasekaskaden eine Chemoresistenz gegenüber einigen Proteinkinaseinhibitoren zu vermitteln.

Diese Ergebnisse müssen jedoch unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass die Expression von Genen ein komplex regulierter Prozess ist und allein die Bindung jener

## Diskussion

Promotoren durch *ERG* noch keinen Hinweis auf die tatsächliche funktionelle Bedeutung zulässt. Ein nächster Schritt könnte sein, die Kinasen auf ihre Koexpression mit *ERG* zu untersuchen, oder den Grad der Phosphorylierung und somit Aktivierung bestimmter MAP Kinasen zu untersuchen, z.B. mittels Immunoblot oder durchflusszytometrischer Bestimmung.

Weitere Versuche könnten unternommen werden, um die Rolle von WNT11 in der Leukämogenese zu explorieren.

Ferner wäre es wünschenswert an Stelle von Sorafenib z.B. spezifische Raf oder FLT3 Inhibitoren einzusetzen. Ziel wäre es, zu eruieren, welcher Teil der MAPK Signalkaskade durch *ERG* reguliert wird und somit gezielte Therapieoptionen für Patienten mit hoher *ERG*-Expression zu entwickeln.



## 6. Zusammenfassung

Das ETS-related Gene *ERG* gehört zur Familie der ETS Transkriptionsfaktoren (TF) und übt Funktionen in der frühen zellulären Entwicklung aus und ist essentiell für die Aufrechterhaltung einer normalen Hämatopoese [49-51, 56]. Darüber hinaus kommen Fusionsgene zwischen *ERG* und verschiedenen Funktionspartnern bei malignen Erkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie (AML), dem Ewing Sarkom und Prostatakarzinomen vor [67, 76, 82]. Des Weiteren konnte eine hohe *ERG*-Expression als ungünstiger prognostischer Faktor in der AML und der akuten T-lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) identifiziert werden [71, 72]. Trotz großer Fortschritte in den Therapieoptionen in den letzten Jahren gibt es immer noch Patienten mit AML oder T-ALL, deren Prognose auf Grund eines schlechten Therapieansprechens und hoher Rezidivraten schlecht ist. Eine solche Gruppe von Patienten sind jene mit hoher *ERG*-Expression, für die ein möglicher Therapieansatz die Inhibition *ERG*-regulierter Signalwege sein könnte.

Allerdings sind bisher nur einige wenige Gene, deren Transkription durch *ERG* reguliert wird (Targetgene), bekannt, so dass das Ziel dieser Arbeit war, Targetgene des TFs *ERG* zu identifizieren, um somit mögliche Ansätze für neue Therapieoptionen der akuten Leukämien zu entwickeln.

Daher wurden Chromatin-Immunopräzipitation on chip (ChIP-chip) Versuche an leukämischen Zelllinien (Jurkat und HL60) und primären Leukämieproben (5 AML, 1 T-ALL) durchgeführt.

Nach statistischer Auswertung wurden die generierten Genlisten einer bioinformatischen Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich eine signifikante Anreicherung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs in der Zelllinie Jurkat sowie AML D und T-ALL ( $p < 0,05$ ). Des Weiteren konnte eine Anreicherung von Signalwegen wie PI3K/AKT, HMGB1, TNFR1, CNTF, p53 und Interferon Signalwege gezeigt werden. Ferner waren Prozesse der Zellmigration und –adhäsion sowie der zellulären Entwicklung und Regulation, Zellwachstum und Proliferation und Prozesse multizellulärer Organismen angereichert ( $p < 0,05$ ). Da diese Prozesse im Rahmen der Leukämogenese Veränderungen unterliegen, ist es denkbar, dass *ERG* durch die Beeinflussung dieser biologischen Funktionen ursächlich an der Leukämogenese beteiligt ist.

Zur Validierung von Targetgenen im Jurkat ChIP-chip mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR) wurden 23 Gene mit Funktionen in der

## Zusammenfassung

Hämatopoese, Onkogenese und WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg ausgewählt. Für 17 dieser Gene konnte eine Anreicherung bestätigt werden.

Zur Validierung mittels qrt-PCR in den primären Leukämieproben wurden 5, in der Literatur beschriebene, mit *ERG* koregulierte Gene ausgewählt. Von diesen konnten *WNT11* und *DAAM1* in 5 bzw. allen 6 Proben durch eine mindestens 2-fache Anreicherung gegenüber der IgG-Kontrolle bestätigt werden. Die übrigen Gene zeigten lediglich eine Anreicherung in einer der Proben.

Die Expression der validierten Gene wurde mittels *ERG knock down* und Überexpression untersucht. Dabei zeigte sich eine konstante und signifikante Verminderung der Expression des Gens *WNT11* mit der Reduktion der *ERG*-Expression durch *knock down* und eine Induktion der *WNT11*-Expression durch *ERG*-Induktion. Dies spricht dafür, dass *ERG* als Transkriptionsaktivator von *WNT11* fungiert. Weiterhin wurde die Proliferation *ERG* exprimierender Zellen mittels WST-Test bestimmt. Dabei zeigt sich ein Proliferationsvorteil der Zellen mit *ERG*-Induktion gegenüber Zellen ohne *ERG*-Expression bei der Behandlung mit dem Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$ , BIO und dem Multikinaseinhibitor Sorafenib. Dies lässt vermuten, dass sich Zellen mit hoher *ERG*-Expression dem antiproliferativen Effekt dieser Substanzen entziehen, indem sie zur vermehrten Expression von Gegenspielern, wie z.B. *WNT11*, beitragen. Daraus ergibt sich, dass die Substanzen BIO und Sorafenib keine geeignete Therapieoption für akute Leukämien mit hoher *ERG*-Expression darstellen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *ERG* die Expression intrazellulärer Signalkaskaden wie WNT/ $\beta$ -Catenin, PI3K/AKT, HMGB1, TNFR1, CNTF, p53 und Interferon Signalwege reguliert und das Beispiel der Resistenz *ERG* exprimierender Zellen gegenüber BIO und Sorafenib verdeutlicht die Notwendigkeit der weiteren Exploration dieser Vorgänge, um gezieltere Therapien zu entwickeln.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Youn, B.S., C. Mantel, and H.E. Broxmeyer, *Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 150-74.
2. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
3. Estey, E. and H. Dohner, *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-907.
4. *National Cancer Institute. SEER Datenbank*.
5. Jaffe, E.S., et al., *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report*. Am J Clin Pathol, 1999. **111**(1 Suppl 1): p. S8-12.
6. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-951.
7. Dugas, M., et al., *German multicenter study group for adult ALL (GMALL): recruitment in comparison to ALL incidence and its impact on study results*. Ann Hematol, 2003. **82**(2): p. 83-7.
8. Spix, C., et al., *Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004*. Int J Cancer, 2008. **122**(8): p. 1859-67.
9. Preston, D.L., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S68-97.
10. Kossman, S.E. and M.A. Weiss, *Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate*. Cancer, 2000. **88**(3): p. 620-4.
11. Pui, C.H., et al., *Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 1991. **325**(24): p. 1682-7.
12. Savitz, D.A. and K.W. Andrews, *Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers*. Am J Ind Med, 1997. **31**(3): p. 287-95.
13. Kane, E.V., et al., *Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults*. Br J Cancer, 1999. **81**(7): p. 1228-33.
14. Pogoda, J.M. and S. Preston-Martin, *Smoking and risk of acute myeloid leukemia in adults*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(3): p. 351-2.
15. Fong, C.T. and G.M. Brodeur, *Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis*. Cancer Genet Cytogenet, 1987. **28**(1): p. 55-76.
16. Kelly, L.M. and D.G. Gilliland, *Genetics of myeloid leukemias*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002. **3**: p. 179-98.
17. Frohling, S., et al., *Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6285-95.
18. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. 2005. **434**(7035): p. 843-850.
19. Mikesch, J.-H., et al., *The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*. 2007. **21**(8): p. 1638-1647.
20. Martelli, A.M., et al., *The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal*

- myelopoiesis and leukemogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010. **1803**(9): p. 991-1002.
21. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
  22. Cory, S., D.C.S. Huang, and J.M. Adams, *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis*. 2003. **22**(53): p. 8590-8607.
  23. Flynn, C.M. and D.S. Kaufman, *Donor cell leukemia: insight into cancer stem cells and the stem cell niche*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2688-2692.
  24. Raaijmakers, M., *Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system*. Haematologica, 2011: p. haematol.2010.028035.
  25. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
  26. Manfred Deitel, N.S., Martin Zeitz, *Harrisons Innere Medizin*2008: ABW Wissenschaftsverlag. 3800.
  27. Pui, C.-H. and W.E. Evans, *Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(2): p. 166-178.
  28. Stone, R.M., M.R. O'Donnell, and M.A. Sekeres, *Acute myeloid leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 98-117.
  29. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
  30. Lowenberg, B., J.D. Griffin, and M.S. Tallman, *Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 82-101.
  31. Gaynon, P.S., et al., *Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer, 1998. **82**(7): p. 1387-1395.
  32. Oikawa, T. and T. Yamada, *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene, 2003. **303**: p. 11-34.
  33. Hsu, T., M. Trojanowska, and D.K. Watson, *Ets proteins in biological control and cancer*. J Cell Biochem, 2004. **91**(5): p. 896-903.
  34. Gille, H., A.D. Sharrocks, and P.E. Shaw, *Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 414-7.
  35. Degnan, B.M., et al., *The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa*. Nucl. Acids Res., 1993. **21**(15): p. 3479-3484.
  36. Hart, A.H., R. Reventar, and A. Bernstein, *Genetic analysis of ETS genes in C. elegans*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6400-8.
  37. Feldman, R.J., V.I. Sementchenko, and D.K. Watson, *The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis*. Anticancer Res, 2003. **23**(3A): p. 2125-31.
  38. Seth, A. and D.K. Watson, *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2462-78.
  39. Oikawa, T., *ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy*. Cancer Sci, 2004. **95**(8): p. 626-33.
  40. Duda, D.G., et al., *Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells*. 2003. **22**(44): p. 6857-6864.
  41. Reddy, E.S., V.N. Rao, and T.S. Papas, *The erg gene: a human gene related to the ets oncogene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(17): p. 6131-5.

42. Rao, V.N., et al., *The human erg gene maps to chromosome 21, band q22: relationship to the 8; 21 translocation of acute myelogenous leukemia*. *Oncogene*, 1988. **3**(5): p. 497-500.
43. Owczarek, C.M., et al., *Detailed mapping of the ERG-ETS2 interval of human chromosome 21 and comparison with the region of conserved synteny on mouse chromosome 16*. *Gene*, 2004. **324**: p. 65-77.
44. Duterque-Coquillaud, M., et al., *New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators*. *Oncogene*, 1993. **8**(7): p. 1865-73.
45. Basuyaux, J.P., et al., *The Ets Transcription Factors Interact with Each Other and with the c-Fos/c-Jun Complex via Distinct Protein Domains in a DNA-dependent and -independent Manner*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(42): p. 26188-26195.
46. Carrere, S., et al., *Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains*. *Oncogene*, 1998. **16**(25): p. 3261-8.
47. Bohne, A., et al., *Epigenetic control of differential expression of specific ERG isoforms in acute T-lymphoblastic leukemia*. *Leukemia Research*, 2009. **33**(6): p. 817-822.
48. Coskun, E., et al., *The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia*. *Leukemia Research*, 2010.
49. Loughran, S.J., et al., *The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells*. 2008. **9**(7): p. 810-819.
50. Birdsey, G.M., et al., *Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3498-506.
51. Iwamoto, M., et al., *Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis*. *Dev Biol*, 2007. **305**(1): p. 40-51.
52. Rainis, L., et al., *The Proto-Oncogene ERG in Megakaryoblastic Leukemias*. *Cancer Res*, 2005. **65**(17): p. 7596-7602.
53. Stankiewicz, M.J. and J.D. Crispino, *ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 2009. **113**(14): p. 3337-3347.
54. Taoudi, S., T. Bee, and A. Hilton, *ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification*. *Genes & Development*, 2011. **25**: p. 251-261.
55. Lefebvre, J.M., et al., *Enforced expression of Spi-B reverses T lineage commitment and blocks beta-selection*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6184-94.
56. Nikolova-Krstevski, V., et al., *ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage*. *BMC Developmental Biology*, 2009. **9**(1): p. 72.
57. Yuan, L., et al., *Antiinflammatory Effects of the ETS Factor ERG in Endothelial Cells Are Mediated Through Transcriptional Repression of the Interleukin-8 Gene*. *Circ Res*, 2009. **104**(9): p. 1049-1057.
58. Hart, A.H., et al., *Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity*. *Oncogene*, 1995. **10**(7): p. 1423-30.

59. Avet-Loiseau, H., F. Mechinaud, and J.L. Harousseau, *Clonal hematologic disorders in Down syndrome. A review.* J Pediatr Hematol Oncol, 1995. **17**(1): p. 19-24.
60. Papas, T.S., et al., *ETS family of genes in leukemia and Down syndrome.* Am J Med Genet Suppl, 1990. **7**: p. 251-61.
61. Zipursky, A., A. Poon, and J. Doyle, *Leukemia in Down syndrome: a review.* Pediatr Hematol Oncol, 1992. **9**(2): p. 139-49.
62. Xavier, A.C., Y. Ge, and J.W. Taub, *Down Syndrome and Malignancies: A Unique Clinical Relationship: A Paper from the 2008 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology.* J Mol Diagn, 2009. **11**(5): p. 371-380.
63. Ng, A.P., et al., *Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in a mouse model of Down syndrome.* Blood, 2010. **115**(19): p. 3966-3969.
64. Mecucci, C., et al., *Acute nonlymphoblastic leukemia with bone marrow eosinophilia and structural anomaly of chromosome 16.* Cancer Genet Cytogenet, 1985. **17**(4): p. 359-63.
65. Ferro, M.R., et al., *t(16;21) in a Ph positive CML.* Cancer Genetics and Cytogenetics, 1992. **60**(2): p. 210-211.
66. Yao, E., et al., *Translocation t(16;21) in acute nonlymphocytic leukemia with abnormal eosinophils.* Cancer Genet Cytogenet, 1988. **36**(2): p. 221-3.
67. Shimizu, K., et al., *An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10280-4.
68. Ichikawa, H., et al., *An RNA-binding Protein Gene, TLS/FUS, Is Fused to ERG in Human Myeloid Leukemia with t(16;21) Chromosomal Translocation.* Cancer Res, 1994. **54**(11): p. 2865-2868.
69. Kong, X.T., et al., *Consistent detection of TLS/FUS-ERG chimeric transcripts in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22) and identification of a novel transcript.* Blood, 1997. **90**(3): p. 1192-9.
70. Pereira, D.S., et al., *Retroviral transduction of TLS-ERG initiates a leukemogenic program in normal human hematopoietic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8239-44.
71. Baldus, C.D., et al., *High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults.* J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4714-20.
72. Marcucci, G., et al., *Overexpression of the ETS-Related Gene, ERG, Predicts a Worse Outcome in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype: A Cancer and Leukemia Group B Study.* Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(36): p. 9234-9242.
73. Eid, M.A., et al., *BAALC and ERG expression in acute myeloid leukemia with normal karyotype: impact on prognosis.* International Journal of Laboratory Hematology, 2010. **32**(2): p. 197-205.
74. Baldus, C.D., et al., *Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review.* Br J Haematol, 2007. **137**(5): p. 387-400.
75. Metzeler, K.H., et al., *ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays.* J Clin Oncol, 2009. **27**(30): p. 5031-8.
76. Perner, S., et al., *TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer.* Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8337-41.

77. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer*. *Science*, 2005. **310**(5748): p. 644-648.
78. Attard, G., et al., *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer*. 2007. **27**(3): p. 253-263.
79. Mackinnon, A.C., et al., *Molecular Biology Underlying the Clinical Heterogeneity of Prostate Cancer: An Update*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2009. **133**(7): p. 1033-1040.
80. Klezovitch, O., et al., *A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(6): p. 2105-2110.
81. Yoshimoto, M., et al., *Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome*. 2008. **21**(12): p. 1451-1460.
82. Sorensen, P.H., et al., *A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG*. *Nat Genet*, 1994. **6**(2): p. 146-51.
83. Horak, C.E. and M. Snyder, *ChIP-chip: a genomic approach for identifying transcription factor binding sites*. *Methods Enzymol*, 2002. **350**: p. 469-83.
84. Buck, M.J. and J.D. Lieb, *ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments*. *Genomics*, 2004. **83**(3): p. 349-360.
85. McCann, J.A., et al., *ChIP on SNP-chip for genome-wide analysis of human histone H4 hyperacetylation*. *BMC Genomics*, 2007. **8**: p. 322.
86. Lozzio, C. and B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. *Blood*, 1975. **45**(3): p. 321-334.
87. Schneider, U., H.-U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. *International Journal of Cancer*, 1977. **19**(5): p. 621-626.
88. Koeffler, H. and D. Golde, *Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity*. *Science*, 1978. **200**(4346): p. 1153-1154.
89. Gallagher, R., et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. *Blood*, 1979. **54**(3): p. 713-733.
90. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
91. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. *Genome Biol*, 2003. **4**(5): p. P3.
92. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. 2008. **4**(1): p. 44-57.
93. Mochmann, L.H., et al., *Genome-wide screen reveals WNT11, a non-canonical WNT gene, as a direct target of ETS transcription factor ERG*. 2011. **30**(17): p. 2044-2056.
94. Wasylyk, B., S. Hahn, and A. Giovane, *The Ets family of transcription factors*. *European Journal of Biochemistry*, 1993(211): p. 7-18.
95. Pscan Software. <http://159.149.109.9/pscan/>.

96. Lin, C.-H., et al., *Gene Regulation and Epigenetic Remodeling in Murine Embryonic Stem Cells by c-Myc*. PLoS ONE, 2009. **4**(11): p. e7839.
97. Lei, H., et al., *A Widespread Distribution of Genomic CeMyoD Binding Sites Revealed and Cross Validated by ChIP-Chip and ChIP-Seq Techniques*. PLoS ONE, 2010. **5**(12): p. e15898.
98. Bastian, L.S., et al., *Analysis of the Megakaryocyte Glycoprotein IX Promoter Identifies Positive and Negative Regulatory Domains and Functional GATA and Ets Sites*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(31): p. 18554-18560.
99. Gupta, S., et al., *FZD4 as a Mediator of ERG Oncogene-Induced WNT Signaling and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells*. Cancer Research, 2010. **70**(17): p. 6735-6745.
100. Feng, Y., J. Wen, and C.-C.J. Chang, *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Hematologic Malignancies*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2009. **133**(11): p. 1850-1856.
101. Rambal, A.A., et al., *MEK inhibitors potentiate dexamethasone lethality in acute lymphoblastic leukemia cells through the pro-apoptotic molecule BIM*. 2009. **23**(10): p. 1744-1754.
102. Ravandi, F., et al., *Phase I/II Study of Combination Therapy With Sorafenib, Idarubicin, and Cytarabine in Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(11): p. 1856-1862.
103. Zhu, X., Y. Ma, and D. Liu, *Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights*. Journal of Hematology & Oncology, 2010. **3**(1): p. 17.
104. Wilhelm, S.M., et al., *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*. Molecular Cancer Therapeutics, 2008. **7**(10): p. 3129-3140.
105. Wu, D. and W. Pan, *GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling*. Trends Biochem Sci, 2009. **35**(3): p. 161-8.
106. Luo, J., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy*. Cancer Lett, 2009. **273**(2): p. 194-200.
107. Soda, M., et al., *Inhibition of GSK-3beta promotes survival and proliferation of megakaryocytic cells through a beta-catenin-independent pathway*. Cell Signal, 2008. **20**(12): p. 2317-23.
108. Holmes, T., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta inhibition preserves hematopoietic stem cell activity and inhibits leukemic cell growth*. Stem Cells, 2008. **26**(5): p. 1288-97.
109. Salek-Ardakani, S., et al., *ERG Is a Megakaryocytic Oncogene*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4665-4673.
110. Brandon, C., L.M. Eisenberg, and C.A. Eisenberg, *WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4132-4141.
111. Zhu, H., et al., *Analysis of Wnt Gene Expression in Prostate Cancer*. Cancer Research, 2004. **64**(21): p. 7918-7926.
112. Uysal-Onganer, P., et al., *Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells*. Molecular Cancer, 2010. **9**(1): p. 55.
113. Lin, Z., et al., *Novel Estrogen Receptor- $\beta$  Binding Sites and Estradiol Target Genes Identified by Chromatin Immunoprecipitation Cloning in Breast Cancer*. Cancer Research, 2007. **67**(10): p. 5017-5024.



114. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2007. **1773**(8): p. 1263-1284.
115. Woll, P.S., et al., *Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells*. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 122-131.
116. Park, S., et al., *Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2010. **95**(5): p. 819-828.
117. Geest, C.R. and P.J. Coffey, *MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis* *Journal of Leukocyte Biology* 2009 **86** (2 ): p. 237-250
118. Nusse, R., *Wnt signaling and stem cell control*. 2008. **18**(5): p. 523-527.
119. Roman-Gomez, J., et al., *Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3462-3469.
120. Martin, V., et al., *Epigenetic regulation of the non-canonical Wnt pathway in acute myeloid leukemia*. *Cancer Science*, 2010. **101**(2): p. 425-432.
121. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More*. *Circ Res*, 2010. **106**(12): p. 1798-1806.
122. Anton, R., H.A. Kestler, and M. Kuhl, *Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(27): p. 5247-54.
123. Sato, N., et al., *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. *Nat Med*, 2004. **10**(1): p. 55-63.
124. Iljin, K., et al., *TMPRSS2 Fusions with Oncogenic ETS Factors in Prostate Cancer Involve Unbalanced Genomic Rearrangements and Are Associated with HDAC1 and Epigenetic Reprogramming*. *Cancer Research*, 2006. **66**(21): p. 10242-10246.
125. Vlaeminck-Guillem, V., et al., *The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis*. *Mechanisms of Development*, 2000. **91**(1-2): p. 331-335.
126. Shiozawa, Y., et al., *The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites*. 2008. **22**(5): p. 941-950.
127. Frisch, B.J., R.L. Porter, and L.M. Calvi, *Hematopoietic niche and bone meet*. *NIHPA*, 2008. **3**: p. 211–217.
128. Waldminghaus, T. and K. Skarstad, *ChIP on Chip: surprising results are often artifacts*. *BMC Genomics*, 2010. **11**(1): p. 414.
129. Carroll, J.S., et al., *Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites*. 2006. **38**(11): p. 1289-1297.
130. Andrau, J.-C., et al., *Genome-Wide Location of the Coactivator Mediator: Binding without Activation and Transient Cdk8 Interaction on DNA*. *Molecular Cell*, 2006. **22**(2): p. 179-192.
131. Fan, X., D.M. Chou, and K. Struhl, *Activator-specific recruitment of Mediator in vivo*. 2006. **13**(2): p. 117-120.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AMKL	akute megakaryoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AraC	Cytosinarabinosid
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
ChIP-chip	Chromatin-Immunopräzipitation on chip
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycylin
DS	Down-Syndrom
ERG	Ets-related Gene
HPC	hämatopoetische Progenitorzellen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
kbp	Kilobasenpaare
MRD	minimale Resterkrankung
PCR	Polymerasekettenreaktion
qrt-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SZT	Stammzelltransplantation
TF	Transkriptionsfaktor
ZKM	Zellkulturmedium

## Anhang

**Tab. S1: Nach ChIP-chip in mindestens 3 der primären Leukämieproben signifikant angereicherte Targetgene.** Dargestellt sind jene 23 Gene, die in mindestens 3 der primären Leukämieproben mittels ChIP-chip eine Anreicherung zeigten. In jeder Spalte sind für die dazugehörige Leukämieprobe zunächst der Anreicherungsfaktor und dann der zugehörige P-Wert für das jeweilige Gen aufgeführt.

Offizielles Gensymbol	Genbezeichnung	AML A	AML B	AML C	AML D	AML E	T-ALL
Anreicherungsfaktor/ P-Wert							
<i>ACOT8</i>	acyl-CoA thioesterase 8		1,85 0,007	1,32 0,05	3,21 0,001		
<i>APOC1</i>	apolipoprotein C-I		1,37 0,03		1,81 0,03		6,57 0,02
<i>ARHGEF2</i>	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2				1,92 0,03	1,89 0,04	4,65 0,05
<i>BDKRB1</i>	bradykinin receptor B1		1,35 0,03		1,74 0,03	2,12 0,04	4,62 0,04
<i>C14orf118</i>	chromosome 14 open reading frame 118			1,46 0,03	2,53 0,006		4,37 0,05
<i>CD59</i>	CD59 molecule, complement regulatory protein		1,36 0,04		1,88 0,03		4,32 0,03
<i>CDKN2D</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)		1,42 0,02	1,47 0,04	3,45 0,009		
<i>CHRM1</i>	cholinergic receptor, muscarinic 1	1,54 0,05				1,39 0,03	7,83 0,01
<i>DYDC1</i>	DPY30 domain containing 1			1,49 0,02	3,32 0,009		6,88 0,03
<i>GAK</i>	cyclin G associated kinase			1,52 0,02	5,84 0,0009	2,23 0,008	
<i>GDF2</i>	growth differentiation factor 2	1,75 0,01			1,81 0,03		5,02 0,04
<i>GLT25D1</i>	glycosyltransferase 25 domain containing 1		1,61 0,02		2,75 0,05		5,85 0,03
<i>GUCY1A3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3		1,50 0,02		4,20 0,02	2,34 0,03	
<i>HMGB1</i>	high-mobility group box 1; high-mobility group box 1-like 10		1,33 0,05		1,58 0,04		5,64 0,03
<i>PCNP</i>	PEST proteolytic signal containing nuclear protein				2,9 0,04	2,22 0,03	5,81 0,02
<i>POU2F1</i>	POU class 2 homeobox 1		1,41 0,04		2,45 0,04		5,56 0,02
<i>PTPN11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11			1,53 0,01	6,49 0,0011		4,80 0,04
<i>RCAN2</i>	regulator of calcineurin 2		1,44 0,04		4,25 0,02	2,38 0,03	
<i>RYR3</i>	ryanodine receptor 3		1,33 0,04		4,32 0,04		4,17 0,05
<i>SIRT5</i>	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5				2,48 0,03	2,24 0,03	4,00 0,05
<i>TDRD5</i>	tudor domain containing 5		1,42 0,03		2,08 0,02		7,27 0,02
<i>UPF3A</i>	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)		1,51 0,02		2,10 0,03		7,35 0,01
<i>WNT2B</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 2B				4,44 0,008	2,00 0,05	4,26 0,04

## Danksagungen

Zu allererst gilt mein Dank Frau Dr. Claudia Baldus für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Das Zustandekommen dieser Arbeit wäre ohne ihre großzügige und vertrauensvolle Unterstützung nicht möglich gewesen.

Ferner danke ich Herrn Dr. Arend Bohne und Frau Liliana Mochmann für die Durchführung der ChIP-chip Versuche an der Zelllinie Jurkat sowie für die Auswertung der hierbei gewonnenen Daten.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Mochmann für die Einarbeitung in die ChIP-chip Methodik sowie die Anleitung bei allen Versuchen im Zusammenhang mit der Zellkultur. Frau Mochmann war jederzeit bereit mir jede Frage geduldig zu beantworten und half mir bei gemeinsamen Laborbesprechungen stets durch konstruktive Vorschläge.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Ortiz-Tanchez für die Einarbeitung in alle Methoden rund um die Polymerasekettenreaktion, einschließlich der Durchführung und Auswertung von quantitativen real-time PCRs. Außerdem wurde die Transfektion der K562 Zellen mit dem *ERG*-induzierbaren Vektorkonstrukt durch Frau Ortiz-Tanchez durchgeführt.

Die Transfektion von KG1 Zellen mit siRNA wurde freundlicherweise von Frau Schlee durchgeführt. Ferner gilt ihr mein Dank für die Einarbeitung in verschiedene Methoden wie dem Isolieren von RNA.

Äußerst dankbar bin ich Frau Mochmann, Frau Ortiz-Tanchez und Frau Schlee für die helfenden Hände, die stets zur Stelle waren, um Versuche zu beenden, PCR-Assays zu starten oder WST-Messungen durchzuführen, wenn ich verhindert war.

Frau Sandra Heesch und Frau Ebru Coskun waren jederzeit bereit mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und stellten mir die eine oder andere Probe zur Verfügung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Thiel für die Bereitstellung von Laborräumen und Materialien sowie dem kritischen Lesen diverser Abstracts.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Müller-Tidow für die Beratung bezüglich der Durchführung von ChIP-chip Versuchen und der Durchführung der Hybridisierungen und statistischen Auswertung der ChIP-chip Versuche an den primären Leukämieproben in seinem Labor.

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA und Hybridisierung der Patientenproben wurde freundlicherweise durch Frau Christine Disselhoff durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Göllner, die mir stets alle Fragen rund um die Statistik und Auswertung von ChIP-chip Versuchen beantwortete.

Schließlich und vor allem gilt mein Dank meiner Familie für die über Jahre bereitwillig gewährte emotionale und finanzielle Unterstützung sowie meinem Lebensgefährten, Thomas Becker, für die häufigen Aufmunterungen, besonders zu Beginn dieser Arbeit, sowie dem unendlichen Verständnis dafür, dass ich auch an den Abenden und Wochenenden des Öfteren zu beschäftigt für gemeinsame Unternehmungen war.

## **Erklärung**

„Ich, Juliane Bock, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung ERG-regulierter Signalwege bei akuten Leukämien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

05.10.2011

Juliane Bock

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Identification of ERG Specific Target Genes by Genome-Wide Screening in T-Lymphoblastic Leukemia (Poster)

Mochmann LH, Neumann K, **Bock J**, Ortiz-Tanchez J, Bohne A, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD

50. ASH Annual Meeting 2008, San Francisco, USA

Genome-Wide Screening of ERG Specific Target Genes in T-Lymphoblastic Leukemia by Chromatin Immunoprecipitation on chip Analysis (Abstract und Vortrag)

**Bock J**, Mochmann LH, Neumann K, Ortiz-Tanchez J, Bohne A, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD

European Students Conference 2009, Berlin

Genome Wide Analysis Reveals WNT11, a Noncanonical WNT Gene as a Target of the ETS Transcription Factor ERG (Poster)

Mochmann LH, **Bock J**, Ortiz-Tanchez J, Schlee C, Neumann K, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD

EHA 15th Congress 2010, Barcelona

Genome Wide Screening Reveals Distinct Signaling Pathways of the ETS Transcription Factor ERG In Primary Acute Leukemia Blasts (Poster)

**Bock J**, Mochmann LH, Göllner S, Thiel E, Müller-Tidow C, Baldus CD

52. ASH Annual Meeting 2010, Orlando, USA

Mochmann LH, **Bock J**, Ortiz-Tanchez J, Schlee C, Bohne A, Neumann K, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD, Genome-wide screen reveals WNT11, a non-canonical WNT gene, as a direct target of ETS transcription factor ERG. *Oncogene*, 2011, **30**(17): p. 2044-2056.

### Ausstehende Publikation

**Bock J**, Mochmann LH, Göllner S, Thiel E, Müller-Tidow C, Baldus CD

**Arbeitstitel:** Identification of ERG regulated signaling pathways in primary acute leukemia by ChIP-chip