Funktion des Runx1-Transkriptionsfaktors während der normalen und aberranten Myelopoese in *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Kira Behrens aus Oldenburg

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. T. DOBNER Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. B. FEHSE Tag der Disputation: 20. Dezember 2013

Hamburg, den 05. Dezember 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie Diese Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2010 bis Oktober 2013 in der Abteilung Molekulare Pathologie am Heinrich-Pette-Institut Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Arbeitsgruppe von Frau Carol Stocking, PhD.

Inhaltsverzeichnis

1		Zusa	mr	nenfassung	.1
2	2 Einleitung			ng	.3
	2.	1	Hä	matopoese	.3
		2.1.1		Das Blut	.3
		2.1.2		Adulte Hämatopoese	.5
	2.	2	Tra	anskriptionsfaktoren in der Hämatopoese	.7
		2.2.1		Funktion der Transkriptionsfaktoren	.8
		2.2.2		Kooperation von Transkriptionsfaktoren	.9
	2.	3	Die	e TF in der Myelopoese	11
		2.3	5.1.	1 PU.1	11
		2.3	5.1.	2 CCAAT-Enhancer-Binding-Proteine (C/EBPs)	12
		2.3	.1.	3 Weitere Transkriptionsfaktoren - IRF8, MafB, Gfi1 und RARα	14
	2.	4	Le	ukämie	15
		2.4.1		Akute Leukämien	15
		2.4.2		Leukämogenese	16
	2.	5	Rι	ınx1	19
		2.5.1		Proteinstruktur	19
		2.5.2		Implikationen von Runx1 in der myeloischen Entwicklung	21
		2.5	5.2.	1 Runx1 in der murinen Hämatopoese	21
		2.5	5.2.	2 Regulation wichtiger myeloischer Gene durch Runx1	22
		2.5	5.2.	3 RUNX1-Mutationen in Erkrankungen des myeloischen Systems	22
3		Frage	est	ellung	26
4		Mate	ria	l und Methoden	27
	4.	.1	Ma	aterial	27
		4.1.1		Chemikalien	27
		4.1.2		Kits	27
		4.1.3		Bakterienstämme	27
		4.1.4		Mausstämme	28
		4.1	.4.	1 Konditionaler Runx1 Knockout	28
		4.1	.4.	2 C57BL/6 J	28
		4.1.5		Zellen	28
		4.1	.5.	1 Primäre Zellen	28
		4.1	.5.	2 Murine Zelllinien	29
		4.1.6		Medien	29
		4.1	.6.	1 Bakterienkulturmedien	29

4.1.6.2	Zellkulturlösungen und Medien	29
4.1.7 Puff	er	31
4.1.8 Anti	körper	33
4.1.9 Plas	smide	35
4.1.10 C	ligonukleotide	
4.1.11 G	eräte	
4.1.12 S	oftware-bioinformatische Analysen	
4.2 Metho	den	
4.2.1 Zell	kulturmethoden	
4.2.1.1	Kultivierung von adhärenten Zellen	
4.2.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen	
4.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	
4.2.1.4	Herstellung infektiöser Viruspartikel	
4.2.1.5	Titerbestimmung	
4.2.1.6	Transduktion von adhärenten Zellen	40
4.2.1.7	Transduktion von Suspensionzellen	40
4.2.1.8	Tamoxifeninduktion	40
4.2.1.9	Isolierung muriner Knochenmarkszellen	40
4.2.1.10	Anreicherung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark zur durchflusszytometrischen Analyse oder zur Transduktion	40
4.2.1.11	Transduktion muriner Progenitorzellen zur in vitro-Kultivierung	41
4.2.1.12	Colony-Forming-Assays	41
4.2.1.13	Pappenheimfärbung	42
4.2.1.14	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	42
4.2.1.15	Durchflusszytometrische-Sortierung	43
4.2.1.16	Vorbereitung von Zellen für Genexpressionsanalyse	43
4.2.1.17	Indirekte Immunfluoreszenz	44
4.2.2 Tier	experimentelle Methoden	44
4.2.2.1	Identifikation transgener Mäuse	44
4.2.2.2	Fluorouracil-Behandlung von Spendermäusen	45
4.2.2.3	Kultivierung von Stamm- und Progenitorzellen für Transplantationen	45
4.2.2.4	Transduktion isolierter und kultivierter Stamm- und Progenitorzellen	46
4.2.2.5	Transplantation transduzierter Stamm- und Progenitorzellen	46
4.2.2.6	Tamoxifenbehandlung <i>in vivo</i>	46
4.2.2.7	Analyse erkrankter Tiere	47
4.2.2.8	Analyse der Blutparameter	48
4.2.2.9	Vorbereitung der Organe zur durchflusszytometrischen Analyse	48

	4.2.2.10	Histologische Methoden	48
	4.2.3 Nuk	leinsäure-analytische Methoden	49
	4.2.3.1	Extraktion von Nukleinsäuren aus primären Zellen	49
	4.2.3.2	Excision-PCR	49
	4.2.3.3	Reverse Transkription	49
	4.2.3.4	Quantitative Real-time-PCR	49
	4.2.3.5	Southern Blot-Analyse	50
	4.2.3.6	Chromatinimmunpräzipitation-DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq)	51
	4.2.3.7	RNA-Sequenzierung	52
	4.2.4 Prot	ein-analytische Methoden	52
	4.2.4.1	Zelllyse und Probenaufbereitung	52
	4.2.4.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE	53
	4.2.4.3	Western Blot und immunologische Detektion	53
5	Ergebnisse)	55
	5.1 Welch	e Funktion hat Runx1 in der myeloischen Differenzierung?	55
	5.1.1 Der Proo	Verlust von Runx1 führt zu einer Vermehrung der myeloischen genitorzellen	55
	5.1.2 Cha ohne	rakterisierung von Granulozyten-Monozyten-Progenitoren mit und e Runx1	58
	5.1.2.1	Runx1 ist für die Regulation der Selbsterneuerungskapazität und Differenzierung myeloischer Progenitoren wichtig	58
	5.1.2.2	Runx1 hat keinen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen monozytärer und ganulozytärer Differenzierung	62
	5.2 Identifi	kation von Runx1-Zielgenen in frühen myeloischen Zellen	65
	5.2.1 Der Gen	Verlust von Runx1 induziert eine gesteigerte Expression HSZ-spezifischer	65
	5.2.2 Ider	tifikation von RUNX1-Zielgenen bei RUNX1-Überexpression	68
	5.2.2.1	Etablierung eines induzierbaren RUNX1 Überexpressionssystems	68
	5.2.2.2	RUNX1-Zielgene im Überexpressionssystem	71
	5.2.3 Ider	tifizierung direkter RUNX1-Zielgene	74
	5.2.3.1	Charakterisierung der FDC-P1-Zelllinie	74
	5.2.3.2	Analyse genomweiter RUNX1-DNA-Bindestellen in myeloischen Progenitoren	75
	5.3 Implika	ation von RUNX1 in der Leukämogenese	79
	5.3.1 Etak	blierung eines induzierbaren in vivo RUNX1-Überexpressionssystems	79
	5.3.2 Hist	ologische Charakterisierung der einzelnen Krankheitsbilder	82
	5.3.3 Dure	chflusszytometrische Charakterisierung der einzelnen Krankheitsbilder	89
	5.3.3.1	Thymome entstehen unabhängig von der Knochenmarkstransplantation	89

1() Anh	ang	~	I
9	Tab	ellen- ເ	Ind Abbildungsverzeichnis	125
8	Abk	ürzung	jsverzeichnis	123
7	Lite	raturve	rzeichnis	108
	6.4	Die du	ale Funktion von Runx1	105
	6.3	Die or	nkogene Funktion von Runx1	103
	6.2.2	2 Rur dur	nx1 reguliert die Zielgenexpression zusammen mit weiteren Faktoren ch die Bindung an <i>Enhancer</i> -Elemente	101
	6.2.	1 Rur	nx1 reguliert die Expression wichtiger Knochenmarksnischenfaktoren	99
	6.2	Zielge	ne von Runx1 in frühen myeloischen Progenitoren	98
	6.1.3	3 Rur der	nx1 hat keinen Einfluss auf die Differenzierungsentscheidung zwischen granulozytären und der monozytären Linie	97
	6.1.2	2 Rur unte	nx1 ist für die Differenzierung myelosicher Progenitoren nicht essenziell, erstützt diese jedoch	96
	6.1.	1 Der Pro	Verlust von Runx1 bewirkt die Expansion des myeloischen genitorkompartiments	95
	6.1	Die Tu	umorsuppressorfunktion von Runx1 in myeloischen Progenitoren	95
6	Disk	kussior	1	95
	5.	3.3.3	RUNX1 und FLT3-ITD induzieren im <i>Runx1^{-/-}</i> Hintergrund akute myeloische Leukämien	91
	5.	3.3.2	FLT3-ITD induziert im <i>Runx1^{-/-}</i> Hintergrund eine myeloproliferative Neoplasien	91

1 Zusammenfassung

Für den homöostatisch sehr fein abgestimmten Prozess der Hämatopoese sind Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung. Dysfunktionen oder Fehlregulationen dieser Proteine können zur malignen Transformation von Blutzellen führen und so Leukämien induzieren. Das für den Transkriptionsfaktor RUNX1 codierende Gen, ist eines der am häufigsten mutierten Gene in akuten Leukämien. Bei Patienten mit akuten myeloischen Leukämien liegt die Inzidenz von Mutationen in diesem Genlocus bei über 30%. Da dennoch nur wenig über die Rolle von Runx1 in der Myelopoese bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion des Transkriptionsfaktors und dessen Zielgene in frühen myeloischen Zellen analysiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die Aktivität von Runx1 für die myeloische Differenzierung wichtig ist. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte die Inaktivierung von Runx1 zu einem erhöhten Anteil unreifer Myeloblasten, sodass es zu einer Beeinträchtigung, nicht aber zu einer Blockade der Differenzierungsvorgänge kam. Weiterhin bestätigten diese Analysen, dass die monozytäre und die granulozytäre Entwicklung in gleichem Maße beeinträchtigt waren, sodass das Gleichgewicht zwischen beiden myeloischen Entwicklungslinien von Runx1 nicht beeinflusst wurde.

Mit Hilfe von gesamtgenomischen Expressionsanalysen myeloischer Progenitoren, die entweder zur Überexpression von RUNX1 manipuliert wurden oder in denen *Runx1* konditional ausgeschaltet wurde, konnten Gene, die für Membran- und Adhäsionsproteine codieren als potentielle Runx1-Zielgene identifiziert werden. Viele dieser Gene stehen mit der Interaktion von Stroma- und Stammzellen im Knochenmark in Verbindung. Stromazellen sind einerseits für den Erhalt der Quieszenz der Stammzellen, andererseits aber auch für die Differenzierung und Proliferation früher Progenitoren essentiell. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Deregulation dieser Proteine zur Akkumulation prä-leukämischer Progenitoren beiträgt, die Zielzellen für sekundäre Mutationen darstellen und schließlich zu einer Leukämie führen können. Runx1-DNA Bindungsanalysen bestätigten, dass es sich bei den meisten deregulierten Genen um direkte Runx1-Zielgene handelt.

De novo-Motivanalysen Runx1-gebundener Regionen bestätigte eine potentielle Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. Ets, Cebp und Gata), die Bestandteile komplexer Netzwerke zur Regulation des Selbsterhalts sowie der Differenzierung früher hämatopoetischer Vorläufer sind. Dass die Abwesenheit von Runx1 nicht an allen Runx1-gebundenen Genen auch Einfluss auf die Transkription nahm, spiegelt vermutlich die unterschiedlichen Funktionen von Runx1 in Synergie mit anderen Faktoren wieder. Dementsprechend reicht das Funktionsspektrum von Runx1 von einem starken Pionierfaktor, der die Rekrutierung anderer Schlüsselfaktoren dirigiert, bis hin zu einem Gerüstprotein, welches lediglich die transkriptionelle Effizienz moduliert. Erstmals konnten, neben den bekannten Runx1 Interaktionspartnern, Co-Lokalisationen mit Motiven der zytokininduzierten Stat-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Dieses legt die Vermutung nahe, dass Runx1 die transkriptionelle Aktivität von Stat steigert und somit auch Überlebens und Proliferationssignale reguliert.

In-vivo-Mausexperimente sollten Aufschluss darüber geben, ob die Inaktivierung von Runx1 und die damit einhergehenden Beeinträchtigung myeloischer Progenitoren zusammen mit einem starken Proliferationssignal, induziert durch die konstitutiven Aktivierung der FLT3-Rezeptortyrosinkinase ausreichend sind, um eine Leukämie zu induzieren. Interessanterweise induzierte die FLT3-Aktivierung in Runx1-deletiertem Knochenmark eine Myeloproliferation, aber keine Leukämie. Die Rekonstitution von RUNX1 hingegen induzierte eine aggressive Leukämie. Dieses liefert einen Hinweis darauf, dass die Inaktivierung von Runx1 zwar die Voraussetzung für die Zelltransformation schafft, eine verbleibende onkogene Runx1-Aktivität jedoch notwendig ist um die Transformation letztlich auszulösen. Hierbei könnte Runx1 mit Stat-Transkriptionsfaktoren zusammenwirken, die durch den FLT3-Signalweg aktiviert werden, und die Transkription transformationsfördernder Gene induzieren. Außerdem könnte das erhöhte Runx1-Niveau ein Milieu schaffen, dass die FLT3-induzierte Transformation begünstigt.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass der Funktionsverlust von Runx1 ein prä-leukämisches Stadium induziert, vermutlich durch die Akkumulation früher myeloischer Progenitoren mit einer beeinträchtigten, aber dennoch nicht blockierten Differenzierung. Weitere Mutationen, wie z.B. die Aktivierung der FLT3-Kinase, induzieren in Synergie mit Runx1 eine akute Leukämie, gekennzeichnet durch eine vollständige Blockade der Differenzierung. Somit trägt sowohl der Funktionsverlust (Tumorsuppressor), als auch der Funktionsgewinn (Onkogen) von Runx1 zur Leukämogenese bei.

2 Einleitung

2.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese bezeichnet den Prozess der Bildung von Blutzellen. Man unterscheidet hierbei die primitive von der definitiven Hämatopoese. Die primitive Hämatopoese findet ausschließlich während der frühen embryonalen Entwicklung statt und führt in erster Linie zur Generierung kernhaltiger Erythrozyten, die die Versorgung des Embryos während der frühen Entwicklung sicherstellt. Die definitive oder adulte Hämatopoese hingegen umfasst den kontinuierlichen Prozess der Bildung reifer Blutzellen aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ). Im Folgenden soll zuerst kurz auf die einzelnen Bestandteile des Blutes eingegangen werden und anschließend die Entstehung der reifen Blutzellen aus HSZ erläutert werden.

2.1.1 Das Blut

Das Blut ist eine besondere Form von Bindegewebe, das zum einen darauf spezialisiert ist Körperzellen mit allen notwendigen Substanzen, wie Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport von Stoffwechselendprodukten sicherzustellen. Zum anderen übernimmt es die wichtige Funktion der Immunabwehr.

Das Blut des Menschen besteht zu etwa 55% aus proteinreichem, wässrigem Blutplasma. Hierin enthalten sind vor allem Salze, Nährstoffe und gelöste Gase zur Versorgung des Stoffwechsels aller Körperzellen, aber auch die sogenannten Serumproteine, wie Immunglobuline, Gerinnungsfaktoren und Proteine zum Transport von Lipiden, Vitaminen und Hormonen. Die zellulären Bestandteile des Blutes machen die restlichen 45% des Blutvolumens aus. Sie lassen sich weiter in rote und weiße Blutzellen - Erythrozyten und Leukozyten - sowie Blutplättchen (Thrombozyten) differenzieren.

Mit 5-6 Millionen Zellen pro μ l Blut machen die Erythrozyten den größten zellulären Bestandteil des Blutes aus. Ihre Aufgabe besteht vor allem darin Sauerstoff zu den Zellen zu transportieren. Um dabei eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen besitzen reife Erythrozyten keinen Zellkern aber große Menge des sauerstoffbindenden Proteins Hämoglobin. Außerdem sind Erythrozyten für den Abtransport von Kohlenstoffdioxid aus dem Gewebe verantwortlich. Thrombozyten, die für die Gerinnung wichtig sind, bilden mit 250.000 – 400.000 Zellen pro μ l den zweitgrößten zellulären Bestandteil des Blutes. Sie haben einen Durchmesser von 1,5 – 3 µm und entstehen im Knochenmark durch Abschnürungen ausgehend von Megakaryozyten. Während der Blutgerinnung stülpen sie Pseudopodien aus und begünstigen so die Thrombusbildung. Mit 5.000-10.000 Zellen pro µl Blut bilden die Leukozyten zwar die kleinste Fraktion der Blutzellen, vermitteln aber die für das Überleben des Organismus wichtige Immunabwehr (Campbell and Reece, 2003). Man unterscheidet myeloische Leukozyten, welche die unspezifische (angeborene) Immunantwort induzieren und somit die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger darstellen, und lymphatische Leukozyten, die für die adaptive Immunantwort verantwortlich sind.

Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind die im Blut patrouillierenden Monozyten und Granulozyten. Granulozyten lassen sich anhand der Zusammensetzung ihrer Granula und dem hierdurch bedingten Färbeverhalten des Zytoplasmas in einer Pappenheimfärbung weiter in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterteilen. Basophile und eosinophile Granulozyten machen mit 1-5% nur einen kleinen Anteil der Zellen im Blut aus und dienen der Abwehr von Parasiten. Neutrophile hingegen, machen den größten Teil der Leukozyten überhaupt aus (60-70%). Ihre Aufgabe besteht in erster Linie in der Phagozytose von Bakterien und anderen Fremdkörpern. Angelockt durch chemotaktische Reize können sie in Gewebe einwandern, Pseudopodien ausbilden und den Keim umschlingen. Die so gebildeten Phagosomen verschmelzen im Innern der Zelle mit den enzymhaltigen Granula, woraufhin das phagozytierte Material intrazellulär verdaut wird. Werden Granulozyten von sehr großen Fremdkörpern aktiviert führt dieses zur Sekretion der lysosomalen Granulakomponenten in das Interstitium ("frustrierte Phagozytose") (Leffell and Spitznagel, 1974).

Monozyten sind ebenso wie Granulozyten in der Lage körperfremde Stoffe durch Phagozytose abzubauen. Wandern sie in Gewebe ein, so differenzieren sie innerhalb weniger Stunden zu phagozytierenden Makrophagen aus. Monozyten haben neben der Aufnahme von körperfremden Stoffen eine weitere wichtige Aufgabe bei der Immunabwehr: Sie sind zur Antigenpräsentation befähigt, d.h. nach der Phagozytose präsentieren sie Antigene des Fremdkörpers auf ihrer Oberfläche. Neben den Monozyten ist es insbesondere die Aufgabe der dendritischen Zellen Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Dendritische Zellen sind als einzige Zellen in der Lage die Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren, indem sie Zytokine ausschütten und naive T-Zellen stimulieren. T- und B-Zellen machen die restlichen 20-30% der Leukozyten im Blut aus und vermitteln die adaptive Immunantwort. T-Zellen werden in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen unterteilt. Zytotoxische T-Zellen erkennen die, von dendritischen Zellen und Monozyten präsentierten, Antigene und induzieren den Zelltod der antigenpäsentierenden Zellen. T-Helferzellen sezernieren zahlreiche Zytokine und können so, abhängig von der Art der sezernierten Faktoren, die zellvermittelte Immunantwort der zytotoxischen T-Zellen oder die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten stimulieren. Im Gegensatz zu den T-Zellen, die die zellvermittelte Immunantwort induzieren,

induzieren die B-Zellen die humorale Immunantwort. Wenn sie durch körperfremde Antigene aktiviert werden, differenzieren sie entweder zur antikörperproduzierenden Plasmazelle oder zur Gedächtniszelle. Plasmazellen produzieren und sekretieren spezifische Antikörper um Pathogene gezielt zu bekämpfen, Gedächtniszellen hingegen bleiben über Jahre erhalten, werden bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen sofort aktiviert und können innerhalb weniger Stunden eine Immunreaktion auslösen, die ein Ausbrechen einer Infektion verhindert (Murphy, *et al.*, 2008).

Die Überlebensdauer der einzelnen Blutzellen, mit Ausnahme der B-Gedächtniszellen, ist nur relativ kurz und variiert zwischen 3 Tagen (Granulozyten) und 4 Monaten (Erythrozyten). Diese geringe Lebensdauer der verschiedenen Blutzellen und der sich daraus ergebende hohe Umsatz im Organismus im Vergleich zur Lebensdauer eines Menschen verdeutlicht, dass der Körper in der Lage sein muss, den Verlust an Blutzellen über den gesamten Lebenszeitraum permanent auszugleichen.

2.1.2 Adulte Hämatopoese

Die adulte Blutbildung findet im roten Knochenmark des Beckens, des Brustbeins und der Rippen, sowie in den langen Röhrenknochen statt. An der Spitze des hämatopoetischen Systems steht die hämatopoetische Stammzelle (HSZ). Sie zeichnet sich durch zwei Eigenschaften aus. 1) Multipotenz, HSZ können in alle hämatopoetischen Zelltypen ausdifferenzieren. 2) Selbsterhaltungskapazität, eine besondere Form der Proliferation, die nur Stammzellen (SZ) möglich ist und für den Erhalt der Stammzellpopulation notwendig ist. SZ können sich auf zwei verschiedene Arten teilen, durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische multipotente Stammzellen. Bei der asymmetrische Teilung hingegen entsteht aus einer Stammzelle eine neue SZ und eine weiter differenzierte Zelle, die weitere Differenzierungsschritte durchläuft und so zur reifen Blutzelle ausdifferenziert. Unter physiologischen Bedingungen teilen sich HSZ nur selten. Im Fall von Blutartmut und Entzündungen können jedoch vermehrt Blutzellen produziert werden. Die Regulation der Stammzellaktivität erfolgt über extrinsische Stimuli. Im Knochenmark liegen HSZ in zwei bestimmten Bereichen, den sogenannten Nischen, vor. Die endosteale Nische umfasst das Endost der Knochen, die vaskuläre Nische bezeichnet den Bereich im Knochen rund um die Blutgefäße. Innerhalb beider Nischen stehen die HSZ in Kontakt mit Stroma- und Endothelzellen, die Liganden für bestimmt Rezeptoren auf der Oberfläche der Stammzellen exprimieren oder sezernieren. Die Faktoren der endostealen Nischenzellen bewirken, dass die HSZ quieszent bleibt. Die vaskuläre Nische bietet die geeigneten Bedingungen zur Proliferation und

Differenzierung der Stammzellen. Im Bedarfsfall könnten HZS durch Zytokinstimulationen, wie z.B. durch G-CSF (*Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor*) aktiviert werden. So wird sichergestellt, dass die Bildung neuer Zellen nur erfolgt, wenn sie auch benötigt werden. Durch die strenge Regulation des Gleichgewichtes zwischen Ruhestadium und Zellteilung wird die Zahl der Zellen konstant gehalten.

Anhand von Transplantationsstudien im Mausmodell konnten zwei verschiedene Stammzellpopulationen identifiziert werden: LT-HSZ (Long Term-HSZ) und ST-HSZ (Short Term-HSZ). LT-HSZ sind Zellen mit einem uneingeschränkten Selbsterhaltungspotential. Sie können das hämatopoetische System einer Maus nach deren letaler Bestrahlung vollständig konstituieren und so das Überleben (>16 Wochen) des Tieres sichern (Spangrude, et al., 1988). Diese Zellen dienen vor allem dem Selbsterhalt der Stammzellpopulationen. Sie sind guieszent und zeichnen sich durch eine niedrige Teilungsrate aus. Pro Tag treten nur 8 bis 10% der LT-HSZ in den Zellzyklus ein, sodass sich jede Stammzelle nur einmal innerhalb von 1-3 Monaten teilt (Bradford, et al., 1997; Cheshier, et al., 1999). ST-HSZ sind nur für einen Zeitraum von 8 Wochen zum Selbsterhalt befähigt (Morrison and Weissman, 1994), dann entwickeln sie sich weiter zu den stärker determinierten multipotenten Progenitoren (multipotener Progenitor; MPP). Diese Zellen haben ein stark eingeschränktes Selbsterhaltungspotential (Morrison, et al., 1997), weisen aber eine hohe mitotische Aktivität auf und differenzieren entweder in lymphatisch- oder myeloisch-determinierte Progenitorzellen (Common Lymphoid Progenitor; CLP; Common Myeloid Progenitor, CMP). CLPs differenzieren über unreife Zwischenstufen zu den, die spezifische Immunreaktion vermittelnden B- und T-Zellen aus. Diesen gegenüber stehen die CMPs, die Vorläufer aller myeloischen Zellen. Unterhalb dieser Progenitoren gabelt sich der Entwicklungszweig in die megakaryozytär-erthroiden (Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor, MEP) oder die granulozytär-monozytären (Granulozyten-Monozyten-Progenitor, GMP) Progenitoren auf. MEPs können entweder zu Erythrozyten oder zu Megakaryozyten ausdifferenzieren. Letztere schnüren schließlich die Blutplättchen, Thrombozyten, ab. Aus den granulozytärmonozytären Vorläuferzellen entwickeln sich, über mehrere Vorläuferstadien, die für die unspezifische Immunantwort wichtigen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Die Herkunft dendritischer Zellen ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch scheinen sie sich aus einem bipotenten Vorläufer zu entwickeln, der in der Lage ist zu dedritischen Zellen oder zu Makrophagen zu differenzieren (Fogg, et al., 2006). Möglicherweise entstehen dendritische Zellen jedoch auch aus einem T-Zell-Vorläufer.



Abb. 1: Schematische Übersicht der adulten Hämatopoese. Dargestellt ist die Entwicklung reifer Blutzellen aus der hämatopoetischen Stammzelle nach dem Akashi-Kondo-Weissman Modell. LT-HSZ: *long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSZ: *short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP: multipotenter Progenitor; CMP: *common myeloid progenitor*; CLP: *common lymphoid progenitor*; MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor; GMP: Granulozyten-Monozyten-Progenitor

Das hier vereinfacht dargestellte Modell der Hämatopoese entspricht dem Akashi-Kondo-Weissman-Schema, bei dem ein binärer Differenzierungsprozess angenommen wird, d.h. Progenitoren und Vorläuferzellen haben die Möglichkeit in zwei verschiedene Zellen zu differenzieren. Viele Studien der letzten Jahre lassen jedoch vermuten, dass der eigentliche Prozess der Hämatopoese deutlich komplexer ist, weitere Zwischenstufen enthält und dass Querverbindungen zwischen den unterschiedlichen Entwicklungspfaden bestehen (zusammengefasst in: Laiosa, *et al.*, 2006 und Iwasaki and Akashi, 2007).

2.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

Die Entstehung reifer Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen ist durch zwei fundamentale Prozesse gekennzeichnet: 1) dem Verlust der Selbsterhaltungskapazität und 2) die Annahme einer spezifischen Linienidentität. Gesteuert werden diese Abläufe durch das Zusammenspiel von zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen, wie Zell-Zell-Interaktionen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen. Hinsichtlich des Mechanismus, wie diese beiden Faktoren zusammenwirken, bestehen zwei Hypothesen. Das stochastische Modell geht davon aus, dass zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren auf niedrigem Niveau bereits in HSZ exprimiert werden und dass die verschiedenen linienspezifischen Transkriptionsfaktoren durch stochastische Mechanismen hochreguliert bzw. abgeschaltet werden. In diesem Modell ermöglichen die exogenen Faktoren lediglich das Überleben und die Proliferation dieser, auf eine Differenzierungsrichtung festgelegten, Zellen. Dem gegenüber steht das instruktive Modell. Es basiert darauf, dass exogene Faktoren (Zytokine) durch rezeptorvermittelte Signale die Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Richtung lenken (zusammengefasst in: Zhu and Emerson, 2002). Beide Mechanismen konnten anhand zahlreicher Experimente untermauert werden, sodass vermutlich beide Modelle zutreffen und ein Hybridmodell den eigentlichen Mechanismus am besten beschreibt (Just, *et al.*, 1991).

2.2.1 Funktion der Transkriptionsfaktoren

Die Regulation der Promotoraktivität eines Gens erfolgt durch die Interaktionen von Transkriptionsfaktoren (trans-regulatorische-Elemente) und cis-regulatorischen Elementen. Zu den cis-regulatorischen Elementen zählen DNA-Sequenzen wie Promotoren, Enhancer und Silencer. Promotoren liegen innerhalb von 1000 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (Zhang, 1998) und beinhalten allgemeine Seguenzelemente, wie die TATA-Box und die Initiatorsequenz zur Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der Polymerase. Dieser, als Kernpromotor bezeichnete, Abschnitt des Promotors ist zwar ausreichend um die Genexpression zu initieren, die transkriptionelle Aktivität ist jedoch in der Regel sehr schwach. Die Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren an proximale Promotorbereiche können die Transkription jedoch verstärken, indem diese zur Rekrutierung oder Stabilisierung der Interaktion der allgemeinen Transkriptionsfaktoren mit dem Kernpromotor beitragen (zusammengefasst in: Farnham, 2009). Die Promotoraktivität kann noch weiter stimuliert werden, wenn spezifische Faktoren an die Enhancer-Elemente eines Gens binden. Diese regulatorischen DNA-Abschnitte beinhalten in der Regel Bindungsmotive für mehrere spezifische Faktoren und können mehrere Tausende Basenpaare vom Promotor entfernt, vor oder hinter dem Transkriptionsstartpunkt liegen. Sie werden als regulatorische Elemente definiert, die die Transkription unabhängig von ihrer Entfernung und Orientierung zum Transkriptionsstartpunkt stimulieren können (Banerji, et al., 1981). Die Bindung spezifischer Faktoren an Enhancer-Elemente

induziert eine Konformationsänderung der Nukleinsäuren, das sogenannte Chromatin looping, sodass Enhancer und Promotor in unmittelbare Nähe voneinander gebracht werden (zusammengefasst in: Krivega and Dean, 2011). Die Aktivierung der Transkription erfolgt anschließend entweder ebenfalls durch die Stabilisierung des Polymerasekomplexes oder durch die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren. Hierzu zählen Kinasen, die die Aktivität der Polymerase II durch deren Phosphorylierung stimulieren und Histon-Acetyltransferasen (HATs) (Dahmus, 1994). Die Rekrutierung von HATs an die DNA führt zur Acetylierung spezifischer Lysinreste der Histone. Dadurch wird deren positive Ladung maskiert und die Affinität zu dem negativ geladenen Rückgrat der DNA vermindert. Es kommt zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur, sodass die DNA für die Transkriptionsmaschinerie besser zugänglich ist und die Transkription des Zielgens verstärkt wird. Im Gegensatz zu den Enhancer-Elementen an denen die Faktorbindung eine transkriptionssteigernde Wirkung hat, führt die Bindung von Transkriptionsfaktoren an distal gelegene Silencer-Elemente zu einer Suppression der Transkription. Diese Faktoren agieren als Repressoren und rekrutieren Histon-Deacetylasen (HDAC), die Gegenspieler der HATs an die DNA. HATs katalysieren die Deacetylierung der Histone und bewirkten so die Kondensation des Chromatins und die Repression der Transkription (zusammengefasst in: Haberland, et al., 2009). Viele Transkriptionsfaktoren können Kontext-abhängig sowohl als Aktivatoren, als auch als Repressoren fungieren.

2.2.2 Kooperation von Transkriptionsfaktoren

Damit in spezifischen Zellen nur ein eingeschränktes Repertoire an Genen exprimiert wird, muss die Aktivität der Tranksriptionsfaktoren sehr sorgfältig reguliert werden. Zum einen erfolgt dieses über die Chromatinstruktur und die relative Konzentration der Transkriptionsfaktoren in der Zelle. Zum anderen kann auch die Bindungsaffinität einzelner Transkriptionsfaktoren an die DNA auf unterschiedliche Weise modifiziert werden. Neben der direkten posttranslationalen Modifikation der Faktoren wie z.B. Phosphorylierung, SUMOylierung und Ubiquitinierung, die Auswirkungen auf die Aktivität und Stabilität der Faktoren haben, spielen insbesondere die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. Die Bindung eines Faktors an die DNA kann beispielsweise die Bindungsaffinität eines weiteren Faktors beeinflussen, man spricht von einer kooperativen Bindung. Gemäß dem klassischen Modell einer kooperativen DNA-Bindung und erhöhen so die DNA-Bindungsaffinität des jeweils anderen Faktors. Dennoch können Transkriptionsfaktoren auch kooperieren ohne dabei in direktem physischem Kontakt zueinander zu stehen. Vier Beispiele solcher, nicht der

klassischen Definition entsprechenden, kooperativen Bindungen sind beschrieben worden (Abb. 2). Zwei Faktoren können beispielsweise an entfernt voneinander liegende Motive binden und dabei die gegenseitige Bindungsaffinität durch die gemeinsame Interaktion mit einem allgemeinen Kofaktor beeinflussen (Abb. 2A) (zusammengefasst in: Spitz and Furlong, 2012). Weiterhin ist eine spezielle Klasse der Transkriptionsfaktoren in der Lage an nukleosomales Chromatin zu binden und so bestimmte *Enhancer*-Elemente zu aktivieren. Solche Pionierfaktoren bewirken die Remodulierung der Chromatinstruktur und machen so Bindungsstellen für weitere Faktoren zugänglich, die zuvor auf Grund der Interaktion mit den Histonen unzugänglich waren (Abb. 2B). Die Bindung eines Transkriptionsfaktors kann auch die Kondensation des Chromatins verhindern oder die Verformung der DNA induzieren und so die Bindung weitere Faktoren an deren Konsensusmotive ermöglichen (assistierte Bindung; Abb. 2C). Letztlich ist es auch möglich, dass Faktoren ohne eine direkte Bindung an die DNA, allein durch die Protein-Protein-Interaktion, an regulatorische Elemente rekrutiert werden (Huckepackbindung; Abb. 2D; zusammengefasst in: Spitz and Furlong, 2012).

In der Regel führt die kooperative Bindung mehrerer Faktoren zu einer erheblichen Steigerung der transkriptionellen Aktivität, die stärker ist als die bloße Summe der Aktivitäten die durch die Bindung der einzelnen Faktoren entstanden wären (Synergie). Allerdings können kooperative Bindungen auch repressiv auf die Transkription wirken, z.B. durch die gemeinsame Rekrutierung eines Repressors wie Groucho oder durch inhibitorische Protein-Protein-Interaktionen. Pu.1 und Gata1 beispielsweise agieren als Antagonisten bei der Differenzierungsentscheidung zwischen der myeloischen und der erythroiden Linie. Die Aktivität von Pu.1 ist entscheidend für die myeloische Differenzierung, während Gata1 die erythroide Differenzierung induziert. Pu.1 kann durch eine direkte Bindung an die DNA-Bindungsdomäne von Gata1 dessen Aktivität blockieren (Zhang, *et al.*, 1999). Im Gegensatz hierzu verhindert Gata1 während der erythroiden Entwicklung die Komplexbildung zwischen Pu.1 und seinem Kofaktor Jun und inhibiert so dessen Aktivität (Zhang, *et al.*, 1999).



Abb. 2: Kooperrative Bindungsmechanismen. TF: Transkriptionsfaktor; PF: Pionierfaktor. Modifiziert nach Spitz and Furlong, 2012.

2.3 Die TF in der Myelopoese

Während der myeloischen Entwicklung sind einige Schlüsselfaktoren für die Regulation der zelltypspezifischen Genexpression von großer Bedeutung. Besonders deutlich wird ihre Funktion in Mausmodellen in denen die gezielte Mutation oder Deletion einzelner Faktoren zum kompletten Verlust ganzer hämatopoetischer Zweige führt. Die wichtigsten dieser myelospezifischen Faktoren sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.3.1.1 PU.1

Der erste, für die myeloische Prägung entscheidende Faktor ist der zur ETS-Familie gehörende Transkriptionsfaktor Pu.1. Das Protein ist das Produkt des Onkogens *Sfpi1* (murin) bzw. *SPI1* (human). Dieses enthält, neben einem Helix-turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung, zwei weitere Domänen zur Protein-Protein-Interaktion. PU.1 ist der wohl wichtigste Regulator der Hämotopoese. Fast alle myelospezifischen und viele lymphospezifischen Gene weisen PU.1 Bindungsmotive innerhalb ihrer regulatorischen Elemente auf (zusammengefasst in: Tenen, *et al.*, 1997). Zudem führt eine Deletion von Pu.1 in der Keimbahn bei Mäusen zu einem neonatal letalen Phänotypen, wobei in der fötalen Leber weder B-Zellen noch Makrophagen gebildet werden (Scott, *et al.*, 1994; McKercher, *et al.*, 1996). Eine Vielzahl konditionaler Knockout-Mausmodelle in denen eine Deletion von Pu.1 in verschieden Differenzierungsstufen induziert wurde, haben dazu beigetragen die Funktion des Faktors in unterschiedlichen hämatopoetischen Linien zu analysieren und haben gezeigt, dass die Konzentration von Pu.1

entscheidend ist. Hohe Konzentrationen von Pu.1 in MPPs bewirken die Differenzierung in die myeloische Richtung (CMP), während bei geringen Konzentrationen die Zelle zum CLP weiter reift (DeKoter and Singh, 2000). Auch während der Differenzierungsentscheidung zwischen der granulozytären und der monozytären Linie scheint Pu.1 von Bedeutung zu sein. Hier bewirken hohe Pu.1-Konzentration die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen, eine geringe Pu.1-Menge hingegen die Entstehung von Granulozyten (Rosenbauer, *et al.*, 2004; Dakic, *et al.*, 2005).

2.3.1.2 CCAAT-Enhancer-Binding-Proteine (C/EBPs)

Die Familie der CCAAT-Enhancer-Binding-Proteinen besteht aus sechs Mitgliedern, C/EBP α - ζ . C/EBP α , β , γ , δ enthalten keine Introns, während C/EBP ϵ und – ζ aus zwei bzw. vier Exons bestehen (zusammengefasst in: Ramji and Foka, 2002). Alle sechs Faktoren gehören zu den Leuzinzipperfaktoren und binden an dieselbe Konsensussequenz (RTTGCGYAAY, R= A oder G, Y= C oder T), wobei allerdings erhebliche Variationen toleriert werden (Osada, et al., 1996). Für die DNA-Bindung ist eine vorherige Dimerisierung unbedingt notwendig. C/EBP-Proteine können sowohl mit anderen Familienmitgliedern Homo- oder Hetereodimere bilden, als auch mit anderen Transkriptionsfaktoren mit oder ohne Leuzinzipper-Domäne dimerisieren. Die N-Termini der einzelnen C/EBP-Proteine sind relativ divergent, ausgenommen dreier kurzer Abschnitte, die mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren und so die transkriptionelle Aktivität regulieren (zusammengefasst in: Ramji and Foka, 2002). Durch die Verwendung unterschiedlicher Translations-Inititations-Codons und Promotoren sowie durch alternatives Splicen können verkürzte Proteine entstehen, die keine Transaktivierungsdomäne enthalten und so als dominant negative Inhibitoren anderer C/EBPs wirken (Descombes and Schibler, 1991; Pabst, et al., 2001). Drei Mitglieder der C/EBP-Familie, α , β und ϵ , spielen während der myelosichen Differenzierung eine wichtige Rolle. Während C/EBPa vor allem in frühen myloischen Zellen exprimiert wird, übernehmen in der späteren myeloischen Ausreifung die βund ε-Proteine wichtige Funktionen.

C/EBPa: C/EBPα ist der zuerst beschriebene und am besten untersuchte Faktor der C/EBP-Familie. Dieser Faktor wird im hämatopoetischen System vor allem in HSZ und in myeloischen Progenitoren exprimiert. Im Laufe der granulozytären Differenzierung nimmt die Expression jedoch ab (Scott, *et al.*, 1992). Durch die Verwendung unterschiedlicher Translations-Inititations-Codons können zwei C/ebpα Proteine gebildet werden, ein 42kDa großes Protein mit vollständiger transkriptioneller Aktivität und eine verkürzte 30kDa-Form, die nur eine der drei Aktivierungsdomänen aufweist und als dominant-negatives Suppressor-Protein

die Aktivität der 42kDa-Form unterbinden kann (Calkhoven, *et al.*, 2000; Pabst, *et al.*, 2001). Die transkriptionell aktive 42kDa-Form reguliert die Expression vieler, während der myeloischen Entwicklung wichtiger Gene, wie die Gene des M-CSF-Rezeptors (Zhang, *et al.*, 1994; Zhang, *et al.*, 1996), des GM-CSF-Rezeptors α (*Granulocyte-Monoyte-Colony-Stimulating-Factor* α) (Hohaus, *et al.*, 1995) des G-CSF-Rezeptors (Smith, *et al.*, 1996), von Pu.1 (Wang, *et al.*, 1999; Yeamans, *et al.*, 2007), von C/ebp α selbst (Timchenko, *et al.*, 1995), der Myeloperoxidase und der neutrophile Elastase (Ford, *et al.*, 1996; Oelgeschlager, *et al.*, 1996). Im Mausmodell führt die konditionale Deletion von Cebpa zu einer Blockade der myeloischen Entwicklung, sodass weder GMPs noch Granulozyten entstehen und die Entwicklung monozytärer Zellen verlangsamt ist (Zhang, *et al.*, 2004). C/ebp α ist somit für die Differenzierung von CMPs zu GMPs unbedingt notwendig. Weitere Studien deuten auf eine zusätzliche Beteiligung von C/ebp α bei der weiteren Differenzierungsentscheidung zwischen der granulozytären und der monozytären Linie hin (Radomska, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 1999; Wang and Friedman, 2002; Wang, *et al.*, 2006).

C/EBPB: Die Expression von Cebpb wird während der Makrophagendifferenzierung verstärkt (Natsuka, et al., 1992), aber auch in Granulozyten wird Cebpb exprimiert (Antonson, et al., 1996). Im Gegensatz zu C/EBP α ist - β für die normale Hämatopoese nicht unbedingt notwendig. So induziert die Inaktivierung von Cebpb im Mausmodell keine schwerwiegenden hämatopoetischen Defekte. Dennoch sind diese Tiere äußert empfänglich für bakterielle Infektionen. Zum einen beruht dieses auf einem Defekt in der Makrophagenaktivierung (Tanaka, et al., 1995), zum anderen ist C/EBPß für die schnelle, Zytokin-induzierte Granulopoese notwendig. So führen Pilzinfektion in Cebpb^{-/-} Mäusen innerhalb von 2-4 Wochen zum Tode, da diese Tiere trotz der Anwesenheit von C/ebpa nicht in der Lage sind schnell genug ausreichend Granulozyten zu produzieren um die Infektion zu bekämpfen (Hirai, et al., 2006). In Cebpa^{-/-} Mäusen kann Cebpb, wenn es in den Cebpa-Locus eingesetzt wird, die Differenzierung granulozytärer Zellen induzieren und den Verlust von C/ebpa kompensieren (Jones, et al., 2002). Die endogene Cebpb-Expression ist jedoch nicht ausreichend, um der blockierten Granulozytenreifung in Cebpa^{-/-} Mäusen entgegenzuwirken (Zhang, et al., 1997). Dieses verdeutlicht die unterschiedliche Regulation beider Proteine. Außerdem kann C/EBPß die Expression von Cepbe verstärken, welche wiederum für die terminale Differenzierung von Granulozyten wichtig ist (Duprez, et al., 2003).

C/EBPE: *Cepbe* wird ausschließlich im hämatopoetischen System und hier insbesondere in späten granulozytären, aber auch in einigen lymphoiden Zellen exprimiert (Yamanaka, *et al.*, 1997b). Die Deletion von *Cebpe* im Mausmodell induziert eine Blockade der granulozytären Entwicklung im Promyelozytenstadium, sodass keine funktionalen Granulozyten gebildet werden (Yamanaka, *et al.*, 1997a). Dieses spiegelt die Notwendigkeit von C/EBPε für die terminale Differenzierung granulozytärer Zellen wieder.

Alle weiteren C/EBP-Proteine werden in hämatopoetischen Zellen nur schwach exprimiert und sind nur wenig untersucht (Network, 2013). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass in Leukämiepatienten mit verminderter C/EBPα-Aktivität die Expression von C/EBPγ deutlich erhöht ist. C/EBPγ besitzt keine Transaktivierungsdomäne, sodass postuliert wird, dass er an Stelle von C/EBPα an dessen Zielgene bindet und diese reprimiert (Alberich-Jorda, *et al.*, 2012).

2.3.1.3 Weitere Transkriptionsfaktoren - IRF8, MafB, Gfi1 und RARa

Weitere Transkriptionsfaktoren sind für die terminale Differenzierung myeloischer Zellen nötig. Während der Ausreifung monozytärer Zellen sind IRF8 (Interferon regulatory factor 8) und MafB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) von Bedeutung. So führt die Inaktivierung von Irf8 in Mäusen zu einer verminderten Anzahl von Makrophagen und einer vermehrten Produktion reifer granulozytärer Zellen und deren Vorläufer (Holtschke, et al., 1996). Auch die Deletion des für MafB codierenden Gens verhindert die vollständige monozytäre Ausreifung fötaler Leberzellen in *in vitro*-Differenzierungsanalysen (Moriguchi, et al., 2006). Die exogene Überexpression des Faktors hingegen induziert die monozytäre Differenzierung bipotenter myeloischer Zelllinien (Hegde, et al., 1999). Für die granulozytäre Ausreifung sind neben C/ebpɛ auch Gfi1 (growth factor independent 1 transcription repressor) und der Retinsäurerezeptor- α (RAR α) wichtig. Der Aktivitätsverlust dieser Faktoren führt zu einer Blockade der granulozytären Differenzierung im Promyelozytenstadium. Gfi1 ist ein transkriptioneller Repressor, der während der granulozytären Diffenzierung die Expression monozytärer Gene inhibiert (Zweidler-Mckay, et al., 1996). RARα hingegen ist ein nukleärer Rezeptor, der als ligandeninduzierbarer Transkriptionsfaktor wirkt, indem er an spezifische Abschnitte in der Promotorregion (RARE; retinoic acid response elements) seiner Zielgene (z.B. C/ebpe) bindet (Park, et al., 1999). In Abwesenheit eines Liganden bildet RARα Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor und rekrutiert einen Korepressorkomplex mit HDAC-Aktivität. Durch die Bindung des Retinsäure-Liganden kann dieser repressive Komplex gelöst werden und Koaktivatoren rekrutiert werden, sodass die Transkription der Zielgene stattfinden kann.

2.4 Leukämie

2.4.1 Akute Leukämien

Geraten die fein abgestimmten Differenzierungsprozesse hämatopoetischer Zellen durch genetische Veränderungen aus dem Gleichgewicht, kann dieses zu einer Leukämie führen. Leukämien sind Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, die durch die stark vermehrte Bildung von Leukozyten und insbesondere deren Vorläuferzellen gekennzeichnet sind. Abhängig vom Verlauf der Erkrankung unterscheidet man zwischen chronischen und akuten Leukämien.

Chronische Leukämien bleiben oft über Jahre unbemerkt, da trotz der verstärkten Proliferation der malignen Zellen reife Blutzellen gebildet werden. Akute Formen hingegen sind lebensbedrohliche Erkrankungen, die unbehandelt innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tode führen. Durch die starke Proliferation unreifer, funktionsunfähiger Vorläuferzellen (Blasten) im Knochenmark werden die gesunden hämatopoetischen Zellen verdrängt und die Blutbildung gestört. Es kommt zu einer verminderten Produktion von Erythrozyten und Thrombozyten, sodass die zelluläre Sauerstoffversorgung erschwert wird und auch die Gerinnung gestört sein kann. Die Folge sind Symptome wie Erschöpfungserscheinungen, Blässe und erhöhte Blutungsneigungen. Zudem bewirkt die verminderte Anzahl funktionsfähiger Leukozyten eine erhöhte Infektionsanfälligkeit der betroffenen Patienten. Je nachdem welche Linie der Hämatopoese von der Transformation betroffen ist, unterscheidet man weiter zwischen myeloischen (AML) und lymphatischen Leukämien (ALL). Letztere ist die bei Kindern dominierende Form der Leukämie. Das altersspezifische Auftreten der ALL hat ihren Höhepunkt im Alter von 2 bis 4 Jahren, nimmt während des späten Kindes- und frühen Erwachsenenalters ab und steigt bei älteren Erwachsenen erneut an. Akute myeloische Leukämien hingegen treten insbesondere im Erwachsenenalter auf. Die Inzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahre linear an, sodass das mittlere Alter beim Ausbruch der Erkrankung bei 65 Jahren liegt (zusammengefasst in: Gilliland and Tallman, 2002).

Akute Leukämien sind durch unterschiedliche Differenzierungsstadien, genetische Aberrationen und schwankende Heilungschancen gekennzeichnet. Das in den 1970er Jahren erarbeitete FAB-Klassifikationsschema (*French-American-British*) ermöglicht es akute Leukämien anhand von morphologischen und zytologischen Kriterien zu kategorisieren (Bennett, *et al.*, 1976). Eine myeloische Leukämie des M0- Differenzierungsgrades entspricht hierbei sehr undifferenzierten Blasten, während M5-Leukämien Monozytenleukämien sind in denen die akkumulierenden Zellen bereits weit differenziert sind. Auch heute kommt die FAB-Nomenklatur in der Klinik noch zur Anwendung, wird aber zusehends durch die modernere WHO- Klassifikation ersetzt, die neben zytologischen auch genetische und immunologische Aspekte in die Einteilung einbezieht (zusammengefasst in: Brunning, *et al.*, 2001).

2.4.2 Leukämogenese

DJB Ashley schlug 1969 ein Modell der Tumorgenese vor, dass davon ausgeht, dass Krebs das Resultat mehrerer aufeinander folgender Mutation in der DNA der betroffenen Zelle ist (Ashley, 1969). Auch für die Transformation hämatopoetischer Zellen scheint dieses zuzutreffen. Damit es zur Akkumulation leukämischer Blasten im Knochenmark kommt muss zum einen das normale Differenzierungsprogramm dieser Zellen gestört sein und zum anderen müssen diese Zellen einen deutlichen Proliferations- oder Überlebensvorteil aufweisen, um in der Lage zu sein die übrigen Zellen des Knochenmarks zu überwachsen (zusammengefasst in: Warner, et al., 2004). Bereits im Jahre 1983 ging eine solche These aus Studien mit dem Vogel-Erythroblastose-Virus (AEV, Avian Erythroboastosis Virus) hervor, in denen die vollständig transformierende Eigenschaft der Viren nur erfolgte, wenn zwei Gene zusammenwirkten (Graf and Beug, 1983). Dash und Gilliland stellten 2001 ein Modell der Leukämogenese vor, welches besagt, dass Leukämien durch Kooperation zweier Klassen von Mutationen entstehen (two-hitmodel). Mutationen der Klasse I induzieren Proliferations- oder Überlebensvorteile, haben aber keinen Einfluss auf die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Klasse II-Mutationen hingegen beeinträchtigen das normale Differenzierungsprogramm der Zellen (Dash and Gilliland, 2001). Die erhöhte Zellteilung, das verlängerte Überleben und die blockierte Differenzierung leukämischer Zellen ist also eine Konsequenz dessen, dass in diesen Zellen Mutationen beider Klassen vorliegen (Gilliland and Tallman, 2002). Unterstützt wird die Hyopthese der mehrstufigen Pathogenese auch durch Mausleukämiemodelle. Mutationen die mit hohen Frequenzen in Leukämiepatienten auftreten, wie beispielsweise die Translokation t(15;17) (90% aller AML-M3), führen im Mausmodell erst nach einer langen Latenzzeit zu einer Leukämie (Grisolano, et al., 1997).

Klasse I-Mutationen, die einen Proliferations- oder Überlebensvorteil induzieren bewirken dieses durch die aberrante Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Diese kann entweder durch die konstitutive Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen oder durch Mutationen in den nachgeschalteten Singalproteinen erfolgen. Die mit Abstand am häufigsten mutierte Rezeptortyrosinkinase ist *FLT3 (FMS-like Tyrosin Kinase 3)*. Der *FLT3*-Locus ist bei ca. 30% aller AML-Patienten mutiert und damit einer der am häufigsten mutierten Genloci in akuten Leukämien (zusammengefasst in: Gilliland and Tallman, 2002). Die Mutationen können in zwei Gruppen unterteilt werden: (1) Interne Tandem-Duplikationen (ITD) betreffen die JuxtamembranDomäne des Rezeptors und führen zur Insertion von 3 bis zu über 400 Basenpaaren, wobei der Leserahmen des *FLT3* Gens erhalten bleibt (Nakao, *et al.*, 1996; Kiyoi, *et al.*, 1998). Die Folge dieser Mutationen ist der Funktionsverlust der autoinhibitorischen Domäne, sodass es zu einer stetigen Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege kommt (Gilliland and Griffin, 2002). Diese vermitteln z.B. durch die Phosphorylierung von STAT5 und die Aktivierung des MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Signalweges, die Zellteilungs- und Überlebensvorteile (Hayakawa, *et al.*, 2000; Brandts, *et al.*, 2005). (2) Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne (KD) betreffen die Aktivierungsschleife und führen so ebenfalls zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit des Liganden (Griffith, *et al.*, 2004). Neben den ITD-Mutationen und den Mutationen der Kinasedomäne, die in 24% bzw. 7% aller AML-Patienten auftreten, konnte in den Blastenzellen vieler AML-Patienten ein erhöhtes Expressionsniveau vom *FLT3* nachgewiesen werden (Abu-Duhier, *et al.*, 2001; Yamamoto, *et al.*, 2001; Gilliland and Griffin, 2002; Kuchenbauer, *et al.*, 2005).

Neben Mutation in *FLT3* treten aktivierenden Mutationen auch in den Klasse III-Rezeptor-Tyrosinkinasen Kit und dem PDGFβ-Rezeptor α (*platelet-derived growth factor*) auf. Während der KIT-Locus bei rund 4% aller AML-Patienten durch Punktmutationen aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung des PDGFβ-Rezeptors durch die Translokation t(5;12) (Golub, *et al.*, 1994; Carroll, *et al.*, 1996). Auch die Translokation t(9;22), die durch die Fusion des für die Abl-Tyrosinkinase codierenden Gens mit dem Aminoterminus von *BCR* (*breakpoint cluster region*) zu dem sogenannten Philadelphia-Chromosom führt, induziert die kontinuierliche Aktivierung von proliferationsfördernden Signalkaskaden. Auch in den *RAS* und *PTPN11* Genen, die für nachgeschaltete Faktoren der Signalübertragung codieren, konnten aktivierende Mutationen nachgewiesen werden (zusammengefasst in: Gilliland, *et al.*, 2004). *RAS* kodiert für eine Familie von Nukleotid-bindenden Proteinen, die die Weiterleitung von Signalen regulieren, indem sie an eine Reihe von Membranrezeptoren, wie beispielsweise FLT3 und KIT, binden (zusammengefasst in: Renneville, *et al.*, 2008). Der *PTPN11*-Locus kodiert für SHP-2, eine für die Signaltransduktion wichtige Thyrosinphosphatase (Hou, *et al.*, 2008).

Mutationen der Klasse II blockieren die Differenzierung hämatopoetischer Zellen und betreffen in der Regel Transkriptionsfaktoren oder deren Kofaktoren. Einer der Schlüsselfaktoren der myeloischen Differenzierung, C/EBPα, ist bei 7-8% aller AML-Fälle von einer Mutation betroffen (Pabst, *et al.*, 2001; Leroy, *et al.*, 2005). Am häufigsten treten diese in granulozytären AMLs des M2-Subtypen auf. Dieses steht im Einklang mit der wichtigen Funktion von C/EBPα während der granulozytären Differenzierung (Radomska, *et al.*, 1998). Zwei unterschiedliche Arten von Mutationen konnten im *CEBPA*-Locus nachgewiesen werden. (1) Mutationen im Aminoterminus die zu einer Leserahmenverschiebung führen, sodass die 42 kDaForm nicht translatiert wird, die Expression der dominant-negativ wirkenden 30 kDa-Form jedoch erhalten bleibt und (Pabst, *et al.*, 2001) (2) Mutationen in der bZIP-Domäne, die die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors beeinträchtigen (Gombart, *et al.*, 2002; Preudhomme, *et al.*, 2002). In Patienten mit biallelischen Mutationen tritt in der Regel je eine der beiden Mutationsarten auf, sodass vermutlich nicht allein der Funktionsverlust von C/EBPα zur Entwicklung von Leukämien beiträgt (zusammengefasst in: Nerlov, 2004).

Der Locus des ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktors RARα auf Chromosom 17 ist bei 90% aller APL-Patienten (*Acute promyelocytic leukemia*; AML-M3) von einer Translokation betroffen. Die am häufigsten nachgewiesene und am besten untersuchte Translokation ist t(15;17), die für das PML/RARα Fusionsprotein kodiert welches bewirkt, dass auch in Gegenwart des Liganden die Interaktion mit dem Korepressorkomplex nicht gelöst werden kann. Die Expression granulozytenspezifischer Gene bleibt aus, sodass es zu einer Blockade der granulozytären Differenzierung im Promyelozytenstadium kommt (zusammengefasst in: Gilliland and Tallman, 2002).

Auch im *Sfpi1* Locus, der für den in der myeloischen Differenzierung wichtigen Faktor PU.1 kodiert, konnte in einer initialen Studie in 7% (9 von126) der analysierten AML-Patienten Mutationen nachgewiesen werden. In erster Linie traten diese in AML-M0 Patienten auf. Unter den beschriebenen Mutationen waren sowohl Deletionen als auch Punktmutationen, innerhalb der DNA-Bindungs- sowie der PEST-Domäne (Mueller, *et al.*, 2002). In nachfolgenden Untersuchungen konnte das Auftreten von PU.1 Mutationen jedoch nicht bestätigt werden (Lamandin, *et al.*, 2002; Vegesna, *et al.*, 2002).

RUNX1 ist ebenfalls das Ziel zahlreicher Mutationen. In fast 30% aller AMLs liegen Translokationen und Punktmutationen im Gen dieses Transkriptionsfaktors vor. Auf diese soll später genauer eingegangen werden.

Neue Technologien haben es in den letzten Jahren ermöglicht ganze Genome zu sequenzieren und auf Mutationen zu überprüfen. Hierbei wurde deutlich, dass das oben beschriebene *two-hit-model* nicht auf alle Leukämiepatienten anwendbar ist. Nur rund 60% aller AML-Patienten weisen Mutationen der Klasse I auf, Mutation der Klasse II konnten bei 40% nachgewiesen werden und nur rund 20% aller AML-Patienten weisen tatsächlich Mutationen der Klasse I und II auf (Network, 2013). Allerdings zeigten diese Untersuchungen, dass Mutationen in epigenetischen Regulatoren, wie DNA-methylierenden und Histon-modifizierenden Faktoren in 74% aller analysierten AML-Proben auftraten (Network, 2013). Die DNA-Methyltransferase DNMT3 (Ley, *et al.*, 2010) ist in 26% aller AML-Fälle mutiert und auch Tet2, ein Enzym, dass die Hydroxylierung von Cytosinresten bewirkt, was wiederum die Bindung von DNA-Methylasen blockiert und so ebenfalls zur DNA-Demethylierung führt, ist häufig mutiert (Valinluck, *et al.*,

2004; Tahiliani, *et al.*, 2009; Network, 2013). Mutation in der IHD1/2 (Isozitratdehydrogenase 1/2) konnten in 20% aller AML-Fälle nachgewiesen werden (Mardis, *et al.*, 2009; Network, 2013). Isozitratdehydrogenasen sind NADP-anhängige Enzyme die Isozitrat in α-Ketoglutarat umwandeln, von dem die TET2- Aktivität abhängig ist. Die in AMLs auftretenden Mutationen im *IDH*-Locus führen zu einer veränderten enzymatischen Aktivität, sodass an Stelle von α-Ketoglutarat 2-Hydroxyglutarate gebildet wird (Dang, *et al.*, 2009). 27% aller AML-Patienten weisen eine Mutation in dem für NPM1 (Nucleophosmin) codierendem Gen auf. Die Funktion des Proteins ist noch weitgehend unbekannt, aber es wird vermutet, dass NPM1 als Histonchaperon fungiert, d.h. an Histonen bindet und so die Assemblierung von Nukleosomen reguliert (Swaminathan, *et al.*, 2005). Mutationen in epigenetischen Regulatoren stellen eine nuck Klasse von Mutationen in Leukämien dar. Die vorhandenen Untersuchungen sind noch nicht ausreichend um abzuschätzen, ob Deregulationen epigenetischer Faktoren Mutationen der Klasse I oder der Klasse II ersetzten können, ob sie allein ausreichend sind um Leukämien zu induzieren oder ob hierzu weitere, z.B. anti-apoptotisch wirkende, Mutationen notwendig sind.

Für die meisten Leukämien ist noch unklar in welchen Zellen die Mutationen stattgefunden haben, die zur Transformation geführt haben. Da leukämische Blasten ebenso wie HSZ die Kapazität der Selbsterhaltung haben, wird häufig postuliert, dass es sich bei leukämischen Zellen um transformierte HSZ handelt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um Progenitoren oder differenzierte Zellen handelt, die die Fähigkeit zu Selbsterneuerung wiedererhalten haben. Für ein HSZ-Hypothese spricht, dass Translokationen wie AML-ETO sowohl in leukämischen Blasten als auch in normalen HSZ von Patienten in Remission nachgewiesen werden konnten. Dieses lässt vermuten, dass die Translokation in einer normalen HSZ stattgefunden hat die dann weitere Mutationen angesammelt hat (Miyamoto, *et al.*, 1996; Miyamoto, *et al.*, 2000). Neuere Studien unterstützen hingegen die Vorläufer-Hypothese. Wenn CMP, GMP und HSZ isoliert und mit dem Onkogenen *MLL-ENL* transduziert wurden, waren die Progenitorpopulationen ebenso wie die HSZ in der Lage in Empfängertieren eine AML auszulösen (Cozzio, *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist die bereits erwähnte Translokation t(15;17) in APL-Patienten. Diese Translokation kann in den gesunden HSZ nicht nachgewiesen werden, sondern nur in den leukämischen Blasten (Turhan, *et al.*, 1995).

2.5 Runx1

2.5.1 Proteinstruktur

Runx wurde zu Beginn der 1990er Jahre gleich von mehreren Wissenschaftlergruppen als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der an spezifische *Enhancer*-Elemente des Moloney

murinen Leukämievirus (Core binding factor; CBFa) und des Polyomavirus (Polyomavirus-Enhancer-Binidng-Protein2; PEBP2α) bindet (zusammengefasst in: Ito, 2004). In Säugern kommen drei hochkonservierte Runx-Faktoren vor, Runx1-3, die zusammen die Familie der Runt-Transkriptionsfaktoren bilden. Alle drei Faktoren binden an dieselben DNA-Sequenzen, unterschieden sich jedoch stark in ihrem Expressionsmuster. Während Runx1 in erster Linie in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, spielt Runx2 vor allem in der Osteogenese eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in: Komori and Kishimoto, 1998). Runx3 wird eine Funktion in der neuronalen sowie der T-Zellentwicklung zugeschrieben. Das humane RUNX1-Gen ist auf Chromosom 21 in Abschnitt g22 lokalisiert und besteht aus 10 Exons (1-6, 7A, 7B, 7C und 8) und zwei Promotoren, P1 und P2. Durch die Verwendung dieser beiden Promotoren sowie durch alternatives Splicen entstehen sowohl im Menschen als auch in der Maus drei unterschiedliche Isoformen des Proteins, RUNX1a, RUNX1b und RUNX1c (Levanon, et al., 2001). Der P1 Promotor kodiert für das in der primitiven Hämatopoese bedeutsame AML1c, die beiden anderen Isoformen werden von dem 160kb stromabwärts gelegenen P2 Promotor transkribiert (Miyoshi, et al., 1995). Runx1b ist der während der adulten Hämatopoese transkriptionell aktive Faktor und anhand von Reportergenstudien konnte gezeigt werden, dass Runx1 mit Ausnahme der erythroiden Linie, in allen hämatopoetischen Entwicklungszweigen exprimiert wird (Lorsbach, et al., 2004).

Die N-terminal gelegenen Runt-Homologie-Domäne besteht aus 128 hoch konservierten Aminosäuren und dient in erster Linie der DNA-Bindung (Konsensussequenz: PyGPyGGTP) (Kamachi, et al., 1990; Melnikova, et al., 1993; Speck and Terryl, 1995). Neben der Nukleinsäureinteraktion erfolgt über diese Domäne die Heterodimersierung mit CBFß (core-bindingfactor β). Durch die Heterodimerisierung wird die DNA-Affinität dieses sogenannten CBF-Komplexes (Core-binding-factor) um ein Vielfaches verstärkt (Meyers, et al., 1993; Ogawa, et al., 1993; Wang, et al., 1993) und der Komplex vor der Degradation geschützt (Huang 2001). Die C-terminal lokalisierte Transaktivierungsdomäne ermöglicht die Bindung vielfältiger Co-Aktivatoren, wie der Histonacetyltransferasen p300 und MOZ (Kitabayashi, et al., 1998; Kitabayashi, et al., 2001). Jeweils C-terminal von diesen beiden charakteristischen Domänen liegt eine Repressorbindungsdomäne. Die vordere stellt die Interaktionsfläche für den Korepressor Sin3a da (zusammengefasst in: Ito, 1999), die hintere ermöglicht die Bindung der Histon-Deacetylasen HDAC1 und 3 (Durst, et al., 2003; Reed-Inderbitzin, et al., 2006; Guo and Friedman, 2011). Interaktionen mit dem repressiven Groucho/TLE- Komplex erfolgen über das am C-Terminus des Proteins lokalisierte VWRPY-Motiv (Aronson, et al., 1997; zusammengefasst in: Ito, 1999).



Abb. 3: Domänenstruktur von RUNX1. RUNX1 besitzt eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne, die RUNT-Domäne, die gleichzeitig für die Heterodimerisierung mit dem Kofaktor CBFβ verantwortlich ist. Am C-Terminus sind eine Transaktivierungsdomäne (TAD), eine inhibitorische Domäne (ID) und das VWRPY-Motiv lokalisiert. Die Region des Kernlokalisationssignales (NLS), des nukleären Matrixsignales (NMS), sowie die Interaktionsfläche mit einer Reihe von Kofaktoren sind gekennzeichnet. Modifiziert nach Ito, 1999.

2.5.2 Implikationen von RUNX1 in der myeloischen Entwicklung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass Runx1 eine wichtige Funktion während der Entwicklung myeloischer Zellen einnimmt. (1) Der Verlust von Runx1 führt im Mausmodell zu einer verstärkten Proliferation myeloischer Vorläuferzellen. (2) Runx1 reguliert eine Reihe von Genen, die für die myeloische Differenzierung essentiell sind. (3) Bei mehr als 18% aller AML-Patienten liegen Mutationen im *RUNX1*-Locus vor. Im Folgenden soll auf diese drei Aspekte näher eingegangen werden.

2.5.2.1 Runx1 in der murinen Hämatopoese

Die Bedeutsamkeit von Runx1 für die hämatopoetische Entwicklung im Allgemeinen konnte eindrucksvoll in Runx1 Knockout-Mausmodell nachgewiesen werden. Diese Tiere versterben pränatal an E12,5 auf Grund von Hämorrhagien des zentralen Nervensystems. Anhand unterschiedlicher Mausmodelle in denen Runx1 in verschiedenen embryonalen Entwick-lungsstufen inaktiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass Runx1 für die Entwicklung definitiver hämatopoetischer Zellen aus hämogenen Endothelzellen, das sogenannte *budding*, notwendig ist, danach für die Bildung und den Erhalt HSZ jedoch nicht mehr erforderlich ist (Chen, *et al.*, 2009). Die Bedeutung von Runx1 in der adulten Hämatopoese wird durch die Analyse konditionaler *Runx1*-Knockout-Mäuse deutlich, die in fast allen Zelltypen des hämatopoetischen Systems Abnormalitäten aufweisen. Neben einem Block der lymphoiden und megakaryozytären

Entwicklung führt der Verlust von Runx1 zu einer deutlichen Expansion des Stammzell- und des myeloischen Vorläuferkompartiments (Ichikawa, *et al.*, 2004; Growney, *et al.*, 2005; Putz, *et al.*, 2006; Ichikawa, *et al.*, 2008). Sowohl die Funktionalität der HSZ, als auch die Frage, ob es sich bei der Myeloproliferation um einen intrinsischen Defekt dieser Zellen handelt, wird kontrovers diskutiert. Auch die Deletion eines *Runx1*-Allels führt im Mausmodell zu einer erheblichen Vergrößerung des Vorläuferkompartiments (Sun and Downing, 2004).

2.5.2.2 Regulation wichtiger myeloischer Gene durch Runx1

Die Transkription vieler in der Myelopoese wichtiger Gene wird durch Runx1 reguliert. Darunter sind zum einen Gene deren Expression für die Funktion myeloischer Zellen wichtig ist, wie die Myeloperoxidase (Gen: Mpo), die neutrophile Elastase (Gen: Elane) (Nuchprayoon, et al., 1994) und die Mastzellprotease 6 (Gen: Tpsb2) (Ogihara, et al., 1999) zum anderen aber auch Gene die für Wachstumsfaktorrezeptoren wie den Thrombopoetinrezeptor (Gen: Mpl) (Satoh, et al., 2008) und der M-CSF Rezeptor (Gen: Csf1r) codieren (Zhang, et al., 1994). Da die Runx-Faktoren relativ schwache Aktivatoren der Transkription sind (Zhang, et al., 1996; Petrovick, et al., 1998; Elagib, et al., 2003) wechselwirken sie häufig mit weiteren Transkriptionsfaktoren um die Transaktivierung zu verstärkten. Ein Beispiel hierfür ist der für den M-CSF-Rezeptor codierende Csf1r-Locus, der durch die gemeinsame Bindung von Runx1, Pu.1 und Cebpa an benachbarte Bindungsmotive in der Promotorregion reguliert wird. Alle drei Faktoren wirken synergistisch und verstärken die transkriptionelle Aktivität des Promotors um ein Vielfaches. RUNX1 und C/EBPα binden kooperativ an die DNA, verstärkten also die Bindungsaffinität des jeweils anderen Faktors. PU.1 hingegen steht zwar über direkte Protein-Protein-Interaktion mit Runx1 in Kontakt, hat aber keinen Einfluss auf dessen Affinität gegenüber der Konsensussequenz (Zhang, et al., 1994; Zhang, et al., 1996; Petrovick, et al., 1998). All diese Gene werden in der Regel von Runx1 aktiviert. Abhängig vom Promotorkontext kann Runx1 durch die Wechselwirkung mit Korepressoren wie Sin3A oder TLE-Proteine die Expression seiner Zielgene aber auch unterdrücken. Beispielsweise während der frühen T-Zellentwicklung ist die Bindung von Runx1 an den CD4 silencer erforderlich um die weitere Differenzierung von CLPs zu CD4⁻ CD8⁻ (DN)-Stadium zu induzieren (Taniuchi, et al., 2002).

2.5.2.3 RUNX1-Mutationen in Erkrankungen des myeloischen Systems

RUNX1 ist eines der am häufigsten deregulierten Gene in akuten myeloischen Leukämien. Mutationen im CBF-Komplex treten bei ca. 40% aller AML-Patienten auf. Darunter sind Translokationen, Punktmutationen und Deletionen. Die Translokation t(8;21) war die erste

chromosomale Aberration des RUNX1-Locus, die beschrieben wurde. Sie induziert die Fusion des RUNX1-Gens auf Chromosom 21 mit dem ETO-Gen auf Chromosom 8. Die Chromosomen brechen hierbei in Intron 5 des RUNX1 und Intron 1a oder 1b des ETO-Gens (Tighe and Calabi, 1994; Tighe and Calabi, 1995; Zhang, et al., 2002), fusionieren und codieren für ein aus 752 Aminosäuren bestehendes chimäres Protein. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Nterminalen Abschnitt des RUNX1 Proteins, inklusive der Runt-Homologiedomäne und dem nahezu kompletten ETO-Protein (Miyoshi, et al., 1993). Der ETO-Anteil des Proteins rekrutiert Co-Repressoren, sodass das Fusionsprotein über die Runt-Homologiedomäne an regulatorische Elemente von RUNX1 Zielgenen bindet und die Transkription inhibiert (Meyers, et al., 1995; Gelmetti, et al., 1998; Lutterbach, et al., 1998; Zhang, et al., 2001; Liu, et al., 2006b). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Translokation t(8;21) die in akuten myeloischen Leukämien am häufigsten auftretende chromosomale Aberration ist und in 12%-15% aller AMLs und 40% aller M2-AMLs auftritt (zusammengefasst in: Peterson and Zhang, 2004). Mehr als 30 verschiedene Translokationen des RUNX1-Locus konnten in Leukämiepatienten bereits nachgewiesen werden, 12 davon in AMLs (zusammengefasst in: Speck and Gilliland 2002 und Blyth, et al., 2005). Auch die β-Untereinheit des CBF unterliegt chromosomalen Veränderungen. Durch eine Inversion des Chromosoms 16 (inv(16)) wird das CBFB-Gen mit dem MYH11-Gen (smoothmuscle myosin heavy-chain) fusioniert. Das chimäre Transkript lässt sich bei 8-10% aller AML-Patienten nachweisen und induziert dort eine akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie (AML-M4Eo) (zusammengefasst in: Speck and Gilliland, 2002). Für beide Fusionsproteine wird eine dominant negative Wirkung gegenüber RUNX1 angenommen. Im Falle von RUNX1-ETO auf Grund der Konkurrenz um RUNX1 Bindungsmotive, im Fall von CBFβ-MYH11 durch eine erhöhte Affinität der RUNX1-Kofaktorbindung (Adya, et al., 1998; Lutterbach, et al., 1999).

Neben Translokationen des *RUNX1*-Locus, die in 20-25% aller *de novo* AML Patienten vorliegen, treten bei weiteren 6-13% Punktmutationen im *RUNX1*-Gen auf (Tang, *et al.*, 2009; Network, 2013). Besonders in den sehr unreifen Leukämien des AML-M0 Subtyps liegen diese häufig vor. In verschiedenen Studien konnten *RUNX1*-Mutationen in 13-40% aller AML-M0s nachgewiesen werden (durchschnittlich 26%) (Osato, 2004; Roumier, *et al.*, 2006; Silva, *et al.*, 2007; Silva, *et al.*, 2009; Tang, *et al.*, 2009). Diese Mutationen des *RUNX1*-Locus lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: (1) Nullmutationen, die dazu führen, dass kein Protein gebildet wird, weil entweder große Deletionen in der DNA vorliegen, oder weil durch eine *nonsense*-Mutation oder eine Verschiebung des Leserahmens ein vorzeitiges Stoppcodon in der DNA-Sequenz eingefügt wurde und das fehlerhafte Transkript durch die NMD-Maschinerie (*non-sense-mediated-dacay*) abgebaut wird und (2) Mutationen innerhalb der *Runt*-Domäne, die zu Proteinen mit einer verminderten DNA-Bindungsaffinität führen (DBM; DNA-Bindungs-

mutationen) (Cammenga, et al., 2007). Genauere Untersuchungen der auftretenden *RUNX1*-Mutationen in AML-M0-Patienten wiesen darauf hin, dass diese häufig auf beiden Allelen auftreten (biallelisch) und in der Regel heterozygot sind. Hierbei weist häufig ein Allel eine Deletion auf, währende das zweite Allel für eine DBM codiert (Osato, et al., 1999; Preudhomme, et al., 2000; Roumier, et al., 2006; Silva, et al., 2007; Silva, et al., 2009).

Die Funktion der DBMs wird noch kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen, dass sie aufgrund ihrer reduzierten DNA-Bindungsaffinität und der erhalten bleibenden Affinität zu CBFβ eine dominant negative Wirkung gegenüber dem Wildtyp-Protein aufweisen (Imai, *et al.*, 2000; Tahirov, *et al.*, 2001; Michaud, *et al.*, 2002; Osato, 2004). Andere Untersuchungen hingegen lassen vermuten, dass RUNX1 neben seiner Funktion als DNA-bindender Transkriptionsfaktor, weitere, von der DNA-Bindung unabhängige, Aktivitäten besitzt. DBMs würden so das Gleichgewicht zwischen DNA-bindungsabhängiger und DNA-bindungsunabhängiger Funktion stören (Cammenga, *et al.*, 2007).

Eine weitere Erkrankung des myeloischen Systems ist durch das Auftreten von RUNX1-Mutationen gekennzeichnet. Heterozygote Keimbahnmutationen im RUNX1-Locus führten zu der autosomal dominant vererbten FPD/AML (Familial Platelet Disorder with propensity to AML) (Song, et al., 1999). Die Erkrankung ist relativ selten, gegenwärtig sind 36 Stammbäume beschrieben. Die klinischen Symptome sind, trotz identischer RUNX1-Mutationen innerhalb eines Stammbaums, unterschiedlich stark ausgeprägte Thrombozytopenien (Mangel an reifen Thrombozyten) und Thrombozytendysfunktionen, sowie bei 40% der Patienten einer Progression zur AML (zusammengefasst in: Liew and Owen, 2011). Analog zu den de novo-AMLs lassen sich auch die Keimbahn-RUNX1-Mutationen in Nullmutationen (Deletionen, nonsense-Mutationen, Verschiebungen des Leserahmens) und DBM unterteilen (vgl. Abb. 4). Es wird angenommen, dass die Ausprägung der Erkrankung vom Maß des RUNX1-Funktionsverlusts bzw. Funktionsgewinns abhängt. Keimbahnmutationen des RUNX1-Locus allein scheinen dennoch nicht ausreichend zu sein um die Entwicklung einer Leukämie zu induzieren, hierzu sind weitere kooperative Mutationen nötig. Häufig sind dieses somatische Mutationen des zweiten RUNX1-Allels. Preudhomme et al, (2000) konnte in einer Untersuchung von 8 FPD-Patienten, die eine AML entwickelten, in sechs Fällen biallelische RUNX1-Mutationen nachweisen. Nur bei einem Patienten kam es zur vollständigen Deletion beider Allele (Preudhomme, et al., 2000). Es liegt also nahe, dass die keimbahninduzierte RUNX1-Haploinsuffizienz den Thrombozytendefekt induziert (Song, et al., 1999) und so zu einer Prädisposition der Leukämie führen kann. Der homozygote Verlust des Transkriptionsfaktors induziert letztlich die Leukämie (Preudhomme, et al., 2009).



Abb. 4: *RUNX1*-Keimbahnmutation in Stammbäumen mit familiärer Plättchen Dysplasie (FPD/AML). DBM-Mutationen sind in rot, Nullmutation sind in blau dargestellt, wobei *non-sense* Mutation als gestrichelte Pfeile und Verschiebungen des Leserahmens als durchgezogene Pfeile dargestellt sind. Modifiziert nach Nickels, *et al.*, 2013

3 Fragestellung

Die Hämatopoese ist ein komplexer Prozess, bei dem durch Zellteilungen und Differenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen reife Blutzellen entstehen. Damit diese Abläufe geordnet erfolgen ist die Funktion von Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung. Treten Fehlregulationen dieser wichtigen Faktoren auf, so kann dieses zur malignen Entartung von Blutzellen, und in der Folge zu Leukämien führen. Eines der am häufigsten mutierten Gene in akuten Leukämien ist *RUNX1*. Bei mehr als 30% aller Patienten mit akuten myeloischen Leukämien ist der *RUNX1*-Locus von Translokationen, Deletionen oder Punktmutationen betroffen. Dennoch ist bis jetzt nur wenig über die Rolle dieses Proteins in der myeloischen Entwicklung bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte, mit Hilfe eines Mausmodells, zunächst die Funktion von Runx1 in der gesunden Myelopoese untersucht werden. Hierzu sollte die Differenzierung früher Knochenmarkzellen analysiert werden, in denen Runx1 konditional ausgeschaltet war, und mit Runx1-exprimierenden Zellen verglichen werden. Zum einen sollten, anhand von *in vitro*-Experimenten die Differenzierungseigenschaften untersucht werden. Zum anderen sollte analysiert werden, ob die Inaktivierung von Runx1 Einfluss auf die Differenzierungsentscheidung zwischen der monozytären und der granulozytären Entwicklungslinie nimmt.

Zur besseren Charakterisierung der Funktion von Runx1 sollten weiterhin Zielgene des Transkriptionsfaktors identifiziert werden. Hierzu sollten Genexpressionsprofile primärer myeloischer Progenitoren mit, ohne oder mit einer erhöhten Runx1-Expression erstellt werden. Für diese Experimente sollte zum einen ein konditionales Runx1 Knockout Mausmodell verwendet werden und außerdem ein *in vivo*-Modell etabliert werden, in dem die Überexpression von RUNX1 induziert werden kann. Potentielle Runx1-Zielgene sollten anschließend mittels der Analyse genomweiter Runx1-Bindungsstellen bestätigt werden.

Neben der Funktion von Runx1 während der normalen Hämatopoese sollte weiterhin die Implikation des Transkriptionsfaktors in der Leukämogenese untersucht werden. In humanen Leukämien treten *RUNX1*-Mutationen häufig zusammen mit aktivierenden Mutationen der FLT3-Rezeptor-Tyrosinkinase auf. Daher sollte ein Mausmodell entwickelt werden, im dem FLT3-ITD allein, zusammen mit einer RUNX1-DNA-Bindungsmutante oder gemeinsam mit dem wilttyp-RUNX1 in Runx1-defizienten Knochenmarkzellen überexprimiert wird. Anhand dieses Models sollte die Rolle von Runx1 während der Leukämogenese charakterisiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Reagenzien und Chemikalien von BD Beckton-Dickinson (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Life Technologies (Darmstadt), MERCK (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkrichen) oder Thermo Scientific (Darmstadt) bezogen.

4.1.2 Kits

Amersham ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare (Freiburg)
DecaLabel DNA Labeling Kit	Thermo Scientific (Darmstadt)
Easy SepMouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit	Stem Cell Technologies (Köln)
EZ-ChIP Chromatin Immunoprecipitation Kit	Millipore (Schwalbach)
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies (Böblingen)
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena (Jena)
Light Cycler 480 SYBR Green I Master	Roche Applied Science (Mannheim)
NEXTflex [™] ChIP Seq-Kit	Bioo Scientific (Austin, Texas, USA)
PeqGOLD TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
ProFection Mammalian Transfection System	Promega (Mannheim)
<i>Taq</i> PCRCore Kit	Qiagen (Hilden)
<i>TrueSeq RNA</i> Kit	Illumina (San Diego, CA, USA)

4.1.3 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurde der *Escherichia coli* Laborstamm XL10-Gold (ultrakompetent, blau/weiß Selektion) verwendet (Stratagene, La Jolla, USA). Die Herstellung kompetenter Bakterien mit Ca²⁺, die Transformation, die Kultivierung und die Stammhaltung erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook and Russell, 2000).

4.1.4 Mausstämme

4.1.4.1 Konditionaler Runx1 Knockout

Der konditionale *Runx1* Knockout-Stamm (B6-*Runx1^{fl/fl}-VavCre*) wurde durch die Verpaarung von homozygoten B6-*Runx1^{fl/fl}* Männchen mit heterozygoten, transgenen *VavCre*-Weibchen, beide im C57BL/6-Hintergrund, generiert (Stadtfeld and Graf, 2005; Putz, *et al.*, 2006). Die Zucht der Tiere erfolgte schließlich durch Verpaarung zweier *Runx1^{fl/wt} VavCre*+ Tiere. Züchtung sowie Genotypisierung der Mäuse wurden von U. Müller (Molekulare Pathologie, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde der Genotyp der Mäuse durch eine erneute Analyse des entnommenen peripheren Bluts am Hemavet (niedrige Thrombozytenzahl) bestätigt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Tiere verwendet, die homozygot für das mit *lox*P-Sequenzen flankierte *Runx1*-Gen waren (B6-*Runx1*^{fl/fl}-*VavCre*), sodass das Exon 4 von *Runx1*, deletiert und das Gen somit inaktiviert wurde. Als Kontrollen dienten Wurfgeschwister ohne Veränderung des *Runx1*-Gens (B6-*Runx1*^{wt/wt}-*VavCre*). Die verwendeten Tiere waren 3 - 4 Monate alt.

4.1.4.2 C57BL/6 J

Als Empfängermäuse für die Transplantation der transduzierten Stamm- und Vorläuferzellen wurden ausschließlich Weibchen des C57BL/6J-Stammes (Jackson Laboratory, Maine, USA) im Alter von 3-6 Monaten verwendet, deren Zucht ebenfalls von U. Müller (Molekulare Pathologie, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt wurde.

4.1.5 Zellen

4.1.5.1 Primäre Zellen

Zum einen wurden Stamm- und Vorläuferzellen, isoliert aus Femur und Tibia 5-FU behandelter C57BL/6 Mäuse, verwendet. Zum anderen wurden Knochenmarkzellen aus konditionalen B6-*Runx1^{fl/f}-VavCre* Mäusen isoliert, auf frühe unreife Zellen selektioniert (negative Selektion von Zellen, die CD5, CD45R(B220), CD11b, Gr1, 7-4 oder Ter119 exprimieren) und die verbleibenden Zellen für die Experimente verwendet.

4.1.5.2 Murine Zelllinien

Phoenix-gp	Derivat der aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnenen Zelllinie 293T mit stabiler Expression der <i>gag</i> und <i>pol</i> Genprodukte ATCC #3514 Kultivierung in DMEM mit 10% FCS-Lonza (Basel, CH)
FDC-P1	murine Knochenmarkzellen aus B6D2F1-Mäusen mit geblockter Differenzierung (Dexter <i>et al.</i> , 1980). Die Zellen wachsen IL-3* abhängig in Suspension. DSMZ-#ACC368 Kultivierung in RPMI1640 mit 10% FCS-Biochrom
SC-1	Zelllinie etabliert aus Mausembryo-Fibroblasten (Hartley und Rowe,1975) ATCC #CRL-1404 Kultivierung in DMEM mit 10% FCS-Biochrom

*Überstand von IL3 produzierenden Zellen, X63-AG8-653 Plasmazytomzellen, transfiziert mit dem Vektor BMGNeo-IL-3 (Karasuyama and Melchers, 1988)

4.1.6 Medien

4.1.6.1 Bakterienkulturmedien

Alle Zusätze für die Bakterienmedien wie Bacto-Trypton und Hefeextrakt stammen von Becton-Dickenson (Heidelberg).

Luria-Bertarni-Medium (LB)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl; pH 7,5
LB-Agar	LB Medium 15 g/l Agar

Die Medien wurden 20 min bei 121°C (1,1 kg/cm²) autoklaviert. Dem LB-Flüssigmedium wurde vor Gebrauch 100 µg/ml Ampicillin (Amp) zugesetzt. Dem Agar (Difco-Laboratories, Hamburg) wurde nach Abkühlen auf 55°C ebenfalls 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt und dieser anschließend in sterile Petrischalen gegossen.

4.1.6.2 Zellkulturlösungen und Medien

Lösungen und Medien für die Zellkultur wurden von Biochrom (Berlin), Lonza (Köln), PAA (Pasching, Österreich), Sigma (Traufkirchen) und Stem Cell Technolonies (Köln) bezogen.
Lösungen

BSA-Lösung		2% BSA, Zellkultur getestet, gelöst in PBS		
Chloroquine-Lösung		25 mM Chloroquine in PBS		
FACS-Puffer		PBS mit 0,5% FCS		
FCS		Fötales Kälberserum (Lonza, Köln; Biochrom, Berlin)		
HBSS-Lösung		HBSS versetzt mit 20 mM HEPES		
(Z)-4-Hydroxytamoxifen (>98% Z-Isomer)		1 mg/ml (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma, Traufkirchen) gelöst in abs. Ethanol		
PBS		140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1,5 mM KH2PO4; pH 7,4		
PBS/FCS/Pen/Strep		PBS, 2% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin		
PBS/FCS/EDTA		PBS, 2% (v/v) FCS, 1 mM EDTA		
Penicillin/Streptomycin		10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin		
Polybren-Lösung		8 mg/ml Polybren in PBS		
Lyse-Puffer		10% (v/v) BD PhramLyse 10x Konzentrat in Wasser (Becton Dickinson, Heidelberg)		
Trypsin/EDTA		0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA (w/v)		
Zellkulturmedien				
DMEM -293T	DMEM, 10% (v/v) FCS-Lonza, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruv 20 mM HEPES			
DMEM -SC-1	DMEM, 10% (v/v) FCS-Biochrom, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruv			
IMDM	IMDM-Trockensubstanz gelöst in Wasser (auf 280 mOs eingestellt); pH 7,6			
IMDM-Medium	IMDM, 5% FCS, 1% PenStrep, 2% Glutamin			
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO			
RPMI	RPMI1640, 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat			
SFEM	Serum Glutan hFlt3L	Free Expansion Medium (Stem Cell Technologies), 4 mM nin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin, 100 ng/m , 100 ng/ml hIL11, 10 ng/ml mIL3, 100 ng/ml mSCF		

Methylzellulose MethoCult GF M3434 (StemCell Technologies, Köln)

Zytokine

Alle Zytokine wurden nach Herstellerangaben gelöst.

Muriner Stammzellfaktor (mSCF)	Peprotech (Hamburg)
Murines Interleukin-3 (mIL-3)	Peprotech (Hamburg)
Humanes Interleukin-11 (hIL-11)	Peprotech (Hamburg)
Humaner Flt3-Ligand (hFlt3-L)	Peprotech (Hamburg)

Lösungen und Reagenzien für Mausversuche

Baytril®, orale Lösung, Wirkstoff: Enrofloxacin	BayerVital GmbH (Leverkusen)
5-FU medac 50 mg/ml, Injektionslösung Wirkstoff: 5-Flourouracil	Medac (Hamburg)
ProTaqs CALfix	BIOCYC GmbH & Co (Luckenwalde)
ProTaqs CALless	BIOCYC GmbH & Co (Luckenwalde)
Tamoxifen (<u>></u> 99%)	Sigma, Traufkirchen

4.1.7 Puffer

Immunfluoreszenzfärbung

Fixierlösung	4% Paraformaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	1% Triton-X in PBS
Blockierlösung	0,5% BSA in PBS
PBS/Tween	0,1% Tween in PBS

DNA-Methoden

Gelelektrophorese

1 x TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1 x TBE	40 mM Trisacetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA

Tris-EDTA (TE)	10 mM TrisHCI (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)		
DNA-Isolation aus Gewebe	n		
Natriumazid-Lösung	1 ml 0.1 M Natriumcitrat in 10 % Ethanol		
Southern Blot			
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0		
50 x Denhardt	1% (w/v) Ficol, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1% (w/v) BSA		
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH, 1 M NaCl		
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl; pH 7,5		
Hybridisierungspuffer	6 × SSC, 0,5 M deionisiertes Formamid, 0,5% (w/v) SDS, 2,5 × Denhardt, 8% (w/v) Dextransulfat, 100 μ g/ml Lachssperma-DNA		
Äquilibrierungspuffer	0,2 M Tris /HCl (pH 7,5), 2 x SSC		
Waschlösung I	1 × SSC		
Waschlösung II	0,1% (w/v) SDS, 0,1 × SSC		
Proteinmethoden			
TCA-Lysepuffer	10 mg Trichlorscetat in 100 ml 150 mM NaCL-Lösung		
10 x TBS	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8)		
TBS/Tween	1 x TBS, 0,1% Tween		
10 x Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM TrisBase		
1 x Laufpuffer	10 x Laufpuffer, 0,1% SDS		
Sammelgel (5%ig)	500 mM Tris (pH 6,7), 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED		
Trenngel (8,5%ig)	370 mM Tris (pH 8,8), 8,5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED		
2 x Probenpuffer	250 mM Tris/HCI (pH 6,8), 4% SDS, 25% Glycerol		
3 x Probenpuffer	180 mM Tris/HCI (pH 6,8), 6% SDS, 28% Glycerol		
Transferpuffer	1 x Laufpuffer, 20% (v/v) Methanol		

Blockpuffer	1 x TBS, 0,5% Tween, 5% Magermilchpulver
Waschpuffer	1x TBS, 0,5% Tween, 2% Magermilchpulver

4.1.8 Antikörper

Chromatinimmunpräzipitation

Anti-Runx1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Levanon und
	Y.Groner (Aziz-Aloya <i>, et al.</i> , 1998)
Rabbit IgG- ChIP Grade	unspezifischer Antikörper; abcam (Cambridge, UK), #ab37415

Proteinbiochemische Methoden

Die Antikörper für proteinbiochemische Methoden wurden von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bezogen und wie unten beschrieben eingesetzt. Primärantikörper wurden in Blockpuffer, versetzt mit 1,5 mM Natriumazid, verdünnt. Sekundärantikörper waren Meerrettich-Peroxidase-konjugiert (HRP, horseradish peroxidase) und wurden in Waschpuffer verdünnt.

primäre Antikörper

Anti-Runx1	(N-20)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege, 200 µg/ml; #sc8563 (1:1000)	
Anti-ERα	(F-10)	monoklonaler Antikörper aus der Maus, 200 μg/ml; #sc-8002 (1:500)	
Anti-GAPDH (6	iC5)	monoklonaler Antikörper aus der Maus, 100 µg/ml; #sc-32233 (1:2000)	
sekundäre An	tikörper		
Anti-Ziege IgG-	HRP	Sekundärantikörper aus dem Esel, 100 µg/ml; #sc-2020 (1:5000)	
Anti-Maus IgG-	HRP	Sekundärantikörper aus der Ziege,100µg/ ml: #sc-2005 (1:5000)	
Indirekte Imm	unfluoreszen:	<u>Z</u>	

Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 1:200 in 0,5% BSA in PBS verdünnt.

Anti-Runx1 (N-20) polyklonaler Antikörper aus Ziege, Santa Cruz (Heidelberg); 200 µg/ml; #sc8563

Anti-Ziege-Alexa 555Sekundärantikörper aus Esel, Molecular Probes, Life Technologies
(Darmstadt); 2 mg/ml; #A-21432

Durchflusszytometrie

Tab. 1: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für Durchflusszytometrie. Die Antikörperklone, sowie die konjugierten Flurorochrome, der Hersteller und die Bestellnummer sind angegeben.

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Katalog-
				nummer
CD3e	145-2C11	APC	BioLegend	100312
CD4	RM4-5	APC	BioLegend	100516
CD4	GK1.5	Biotin	BioLegend	100404
CD5	53-7.3	Biotin	BioLegend	100604
CD8a	53-6.7	Biotin	BioLegend	100704
CD8a	53-6.7	PE/Cy7	BioLegend	100722
CD11b	M1/70	FITC	BioLegend	101206
CD11b	M1/70	APC	BioLegend	101212
CD11b	M1/70	PE/Cy7	BioLegend	101216
CD11c	N418	APC	BioLegend	117310
CD16/32	93	FITC	BioLegend	101198
CD16/32	93	PE	BioLegend	101308
CD19	6D5	APC	BioLegend	115512
CD41	MWReg30	FITC	Becton Dickinson	553848
CD41	eBioMWReg30	Biotin	eBioschience	13-0411-82
CD105	MJ7/18	PE/Cy7	Becton Dickinson	120410
CD117 (kit)	2B6	APC	BioLegend	105812
CD150	TC15-12F12.2	PE/Cy7	BioLegend	115914
CD150	TC15-12F12.2	PerCP/Cy5.5	BioLegend	115922
B220	RA3-6B2	APC	BioLegend	103212
F4/80	CI:A3-1	PE	BioLegend	122616
Gr1	RB6-8C5	PE	BioLegend	108408
Gr1	RB6-8C5	APC	BioLegend	108412
Ly6c	AL-21	APC	Becton Dickinson	560595
Ly6g	1A8	PE	Becton Dickinson	551461
MHCII (I-A/I-E)	M5/114.15.2	FITC	BioLegend	107606
Sca	E13-161.7	FITC	BioLegend	553335
sca (Ly6A/E)	D7	PE/Cy7	BioLegend	108114

Sca	E13-161.7	Biotin	Becton Dickinson	553334
TER-119	TER-119	PE/Cy7	BioLegend	116222
Antikörper für				
Kompensationen				
CD45 LCA	30-F11	FITC	BioLegend	103108
CD45 LCA	30-F11	PE	BioLegend	103106
CD45 LCA	30-F11	APC	BioLegend	103112
CD45 LCA	30-F11	PerCP/Cy5.5	Becton Dickinson	550994
Zweitantikörper				
Streptavidin (SA)		APC/Cy7	BioLegend	405208

4.1.9 Plasmide

Angegeben sind die laborüblichen Bezeichnungen mit einer genaueren Beschreibung der Plasmide. Plasmide, die mit R gekennzeichnet sind, wurden in der Arbeitsgruppe "Molekulare Pathologie" hergestellt. Plasmide, die mit # gekennzeichnet sind, stammen aus anderen Quellen.

Retrovirale Konstrukte

R1484	pMIG-Strep-RUNX1-R135G-hERt2-eGFP

R1485 pMIG-Strep-RUNX1-hERt2-eGFP

R1494 pMIG-Strep-hERt2-eGFP

R1586 pRMys-Flt3ITD-iBFP-2a-puro+

Helferplasmide für die Virusproduktion

R690 pSV40-gag/pol trägt die MoMLV *gag-* und *pol-*Gene unter Kontrolle des SV40-Promotors (Beyer, *et al.*, 2002)

#522 pEcoenv-I-puro trägt das ökotrope MoMLV-*env*-Gen unter Kontrolle der EF1α-Promotors (Morita, *et al.*, 2000)

4.1.10 Oligonukleotide

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide sind mit ihrer Orientierung, dem Verwendungszweck, der Größe des amplifizierten Fragments, der jeweiligen Annealingtemperatur und ihrer Sequenz dargestellt. *F: forward; R: reverse*

Primer	Amplifi-	Fragmentgröße	Annealing-	Sequenz 5' →3'		
	kation von		temperatur			
q <i>RT</i> -PCR						
cs1818 (F)	Jam3	200 bp	60°C	ttg cat cat tac gga ctc aca		
cs1819 (<i>R</i>)				caa cga cct cac agc gat ag		
cs1840 (F)	Dlk1	196 bp	60°C	tcc cct ctg tga caa gtg tg		
cs1841 (<i>R</i>)				tgt gca gga gca ttc gta ct		
cs1848 (F)	Ly6c1	188 bp	60°C	gac ttc ctg ccc agc agt ta		
cs1849 (<i>R</i>)				aga ggt ctt cgc tgc aac ag		
cs1850 (F)	Mpl	200 bp	60°C	agc aac aag acc gca cta gc		
cs1851 (<i>R</i>)				cgc tgt ggt cac ctc tac aa		
cs1858 (F)	Treml1	161 bp	62°C	gga gga cac agg gga gta tg		
cs1859 (<i>R</i>)				aga ctt ccg gtt ccg att ct		
MKF35 (<i>F</i>)	Hprt	250 bp	62°C	gct ggt gaa aag gac ctc t		
MFK36 (<i>R</i>)				cac agg act aga aca cct gs		
Genotyp-PCR						
cs507 (<i>R</i>)	Runx1	260 bp (wt/wt)	55°C	gcc ggg tgc aat att aag tc		
cs508 (<i>F</i>)		382 bp (Δ/Δ)		tag gga gtg ctg ctt gct ct		
cs509 (<i>R</i>)				ctc tgg gaa acc agg gag tc		

4.1.11 Geräte

Genannt werden hier nur die für die Datenerhebung relevanten Geräte. Weitere Geräte wie Zentrifugen, Pipetten, Waagen und Brutschränke entsprechen heutigen Laborstandards und werden nicht gesondert aufgeführt.

Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen)	
Durchflusszytometer	BD FACS Canto Flow Cytometer mit der FACS Diva Software Version 5.1.3 (Becton Dickinson, Heidelberg)	
	BD FACS Canto II Flow Cytometer mit der FACS Diva Software Version 6.0.1 (Becton Dickinson, Heidelberg)	
Durchflusszytometer mit Sortierfunktion	BD FACS Aria Flow Cytometer mit Sortierfunktion und FACS Diva Software Version 6.1.2.3 (Becton Dickinson, Heidelberg)	

ELISA-Reader	Tecan Sunrise Remote (Tecan, Austria GmbH, Grödlig, Öster- reich)			
Light Cycler	LightCycler 480 II mit der LightCycler 480 Software Version 1.5.0 SP4 (Roche, Mannheim)			
Konfokalmikroskop	Zeiss-LSM 510 Confo Cor 2 mit der LSM-FCS Software Version 3.2 SP2			
PippinPrep	Sage Science (Beverly, MA, USA)			
Qubit	Invitrogen (Life technologies, Darmstadt)			
Sequenzierplattform	Genome Analyzer IIx (Illumina, San Diego, CA, USA HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, USA)			

4.1.12 Software-bioinformatische Analysen

Aligner / Readmapper	Bowtie Version 0.12.8 (ChIP-Seq) (Langmead, et al., 2009)		
	Bowtie2 Version 2.1.0 (RNA-SEq) (Langmead and Salzberg, 2012)		
Peakcaller	MACS Version 1.4.1 (Zhang, et al., 2008)		
Motivdatenbank	MEME Suit Version 4.8.1 (Bailey, et al., 2009)		
	MEME (Multiple Em for Motif Elicitation)		
	TOMTOM (Motif ComparisonTool)		

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden bei 37°C und einer relativen Luftfeuchte von 95% in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurde mit vorgewärmten Lösungen gearbeitet.

4.2.1.1 Kultivierung von adhärenten Zellen

Adhärent wachsende Zellen wurden in beschichteten Gewebekulturschalen subkonfluent gehalten. Je nach Dichte der Zellen und Wachstumsgeschwindigkeit wurden diese alle 2-3 Tage passagiert und hierbei im Verhältnis 1:3-1:6 verdünnt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen, anschließend 2 min bei Raumtemperatur in Trypsin/EDTA inkubiert und in frischem Medium suspendiert.

4.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die suspendiert wachsenden Zellen (FDC-P1) erfolgte in nicht beschichteten Gewebekulturschalen. Die Zellen wurden abhängig von Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit 1:8 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt.

4.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden adhärerente Zellen durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst, bzw. Suspensionszellen direkt aus der Kultur entnommen und 1 x 10⁶ Zellen abzentrifugiert (5 min, 300 x g, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden anschließend einen Tag im Einfriercontainer (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) bei -70°C gelagert und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung von Zellen wurden diese bei 37°C aufgetaut und tropfenweise vorgewärmtes Kulturmedium hinzupipettiert. Nach Zentrifugation (5 min, 300 x g, Raumtemperatur) wurden die Zellpellets in Kulturmedium resuspendiert und wie oben beschrieben kultiviert.

4.2.1.4 Herstellung infektiöser Viruspartikel

Die Herstellung infektiöser Viruspartikel erfolgte durch Kotransfektion von drei Plasmiden in die Produzentenzelllinie 293T mittels Calciumphosphat. In einem gamma-retroviralen Vektor wurden die für die Virusbildung essentiellen *gag-, pol-* und *env*-Sequenzen durch die cDNA-

Sequenz des Zielgenes ersetzt. Diese für die Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine codierenden Sequenzen wurden mittels zweier weiterer Vektoren kotransfiziert. Nur solche Zellen, die alle zuvor genannten Plasmide enthielten waren in der Lage infektöse Viruspartikel zu sezernieren. Da diese Viruspartikel die cDNA-Sequenz des Zielgenes, nicht aber die *gag-, pol-* und *env-*Sequenzen enthielten, waren sie replikationsinkompetent, induzierten aber nach Integration des Proviurs in die DNA der Zielzelle die Expression des Zielgens (Zufferey et al, 1998). Als *env-*Gen wurden das *Ecoenv* verwendet. Dieses kodiert für ein ökotropes Hüllprotein, das die Infektion muriner Zellen über den CAT-1 Rezeptor ermöglicht.

Die Transfektion erfolgte mit dem *Profection Mammalian Transfection Kit.* Etwa 12 Stunden vor der Transfektion wurden 3×10^6 293T-Zellen ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und mit 25 µM Chloroquin versetzt. Für die Herstellung von Gammaretroviren wurden 5 µg retroviraler Vektor, 10 µg pSV40-gag/pol und 3 µg pEcoenv in 500 µl 0,25 mM Calciumchlorid-Lösung aufgenommen und tropfenweise zu 500 µl 2 x HEPES-Puffer hinzupipettiert. Gleichzeitig wurden, mit Hilfe einer Pasteurpipette, Luftblasen im Präzipitationspuffer erzeugt. Zur Bildung des Calciumphosphat/DNA-Präzipitats wurde der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 8 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 6 ml DMEM ersetzt. Viermal in Folge wurde alle 8-14 Stunden virushaltiger Überstand abgenommen, filtriert (Millex-GP Filter, 0,2 µm, Millipore) und den Zellen 6 ml frisches Medium zugegeben.

4.2.1.5 Titerbestimmung

Um die Anzahl der infektiösen Einheiten pro Milliliter produziertem Virusüberstand - den Virustiter - zu kalkulieren, wurden SC-1 Fibroblasten mit einem determinierten Volumen des infektiösen Virusüberstands infiziert. 20µl oder 100µl. Je Loch einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^4 SC-1 Zellen in 500 µl DMEM ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurden dem Medium 8 µg/ml Polybren (Sigma, Traufkirchen) und 20 µl bzw. 100 µl Virusüberstand zugesetzt. Anschließend wurde die Platte eine Stunde bei 700 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein Virusüberstand zugegeben wurde. 24 Stunden nach der Infektion wurde das Medium ausgetauscht. Weitere 48 Stunden später wurden die Zellen abgelöst, gewaschen und durchflusszytometrisch der Anteil infizierter Zellen bestimmt. Für die Berechnung des Virustiters sollte die Infektionsrate unter 10% liegen um Mehrfachinfektionen zu vermeiden. Die infektiösen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) konnten mit Hilfe folgender Formel berechnet werden: T = Z × A/V (T: Titer, Z: Anzahl der ausgesäten Zellen, A: Anteil der infizierten Zellen, V: Volumen des bei der Infektion eingesetzten Virusüberstands)

4.2.1.6 Transduktion von adhärenten Zellen

Um die adhärent wachsenden SC-1 Fibroblasten zu infizieren wurden ca. 3×10^5 Zellen in 2 ml Kultivierungsmedium in einer beschichten 6-Lochplatte ausgesät. Nach der Zugabe von 2 ml Virusüberstand sowie 8 µg/ml Polybren wurde die Platte eine Stunde bei 750 x g zentrifugiert.

4.2.1.7 Transduktion von Suspensionzellen

Zur Infektion der suspendiert wachsenden FDC-P1 Zellen wurden $2-3 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Kultivierungsmedium in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Anschließend wurden diese mit 2 ml Virusüberstand versetzt und 100 µl IL-3-haltiger Überstand hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 5% IL-3 zu gewährleisten. Um die Infektion zu begünstigen wurden der Zellsuspension 8 µg/ml Polybren zugesetzt und die Platte eine Stunde bei 750 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Am folgenden Tag wurde die Infektion wiederholt. Zur Anreicherung infizierter Zellen wurden diese durchflusszytometrisch sortiert (vgl.: 4.2.1.15).

4.2.1.8 Tamoxifeninduktion

Um in den transduzierten SC-1 und FDC-P1 Zellen die Translokation des RUNX1-(R135G)-ERt2 Fusionsproteins vom Zytoplasma in den Zellkern zu induzieren wurden transduzierte Zellen für 24 Stunden mit 1 µM Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt. Dieses wurde direkt dem Kulturmedium zugegeben.

4.2.1.9 Isolierung muriner Knochenmarkzellen

9–12 Wochen alte Mäuse wurden in Narkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tiere in 70%igem Ethanol semi-sterilisiert und Femora und Tibiae unter der sterilen Werkbank freigelegt. Zum Ausspülen der Knochenmarkzellen wurden die Knochen mittels einer 1 ml-Spritze mit einer 23 Gauge-Kanüle mit IMDM-Medium durchspült und die Zellen durch mehrfaches Aufziehen der Suspension vereinzelt. Anschließend wurde die Knochenmarkzellen in PBS/FCS/Pen/Strep aufgenommen und für 5 Minuten bei 300 x g und 4°C gewaschen.

4.2.1.10 Anreicherung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark zur durchflusszytometrischen Analyse oder zur Transduktion

Die Anreicherung möglichst undifferenzierter Progenitorzellen aus dem isolierten Knochenmark erfolgte anhand des $EasySep^{TM}$ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kits nach Angaben des Herstellers. Alle Arbeitsschritte wurden mit vorgekühlten Reagenzien

durchgeführt. Zunächst wurden die isolierten Zellen mit einem Gemisch biotinylierter Antikörper (CD5, CD11b, CD19, CD45R (B220), 7-4, Ly-6G/C (Gr-1) und Ter119) und anschließend mit bispezifischen, tetrameren Antikörper-Komplexen (*bispecific Tetrameric Antibody Complexes*; TAC), die sowohl Biotin, also auch Dextan binden, inkubiert. Durch die Zugabe Dextrankonjugierter, magnetischer Partikel und die Inkubation des Gemisches in einem starken Magneten fand eine Negativselektion unreifer Knochenmarkzellen statt, welche die oben beschriebenen Oberflächenantigene nicht exprimierten.

Die so isolierten Stamm- und Progenitorzellen wurden entweder direkt durchflusszytometrisch analysiert/sortiert (vgl.: 4.2.1.15) oder *in vitro* mit gammaretroviralen Partikeln transduziert (vgl.:4.2.1.7) und weiter analysiert.

4.2.1.11 Transduktion muriner Progenitorzellen zur in vitro-Kultivierung

Vor der Transduktion der Progenitorzellen wurden unbeschichtete 6-Loch-Platten über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 2 ml Retronektin (50 µg/ml, TaKaRa, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) beschichtet. Nach dem Entfernen des Retronektins wurden die Platten 30 min mit 2 ml PBS/2%BSA pro Loch blockiert und anschließend mit 3 ml HBSS/HEPES gespült. Zur Beschichtung der Platten mit Viren wurden 1,5 ml Virusüberstand pro Loch auf die Platten gegeben und diese 20 Minuten bei 700 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml Virusüberstand entfernt, verworfen, durch frischen Überstand ersetzt und die Platte erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Parallel hierzu wurden die zuvor angereicherten Progenitoren durch Zentrifugation (5 min, 300 x g) pelletiert und zur *in vitro* Kultivierung in SFEM resuspendiert. Nachdem der letzte Virusüberstand entfernt worden war, wurden die Zellen in einer Dichte von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen pro ml auf den Virusbeschichteten Platten ausgesät. Diese Infektionsprozedur wurde am folgenden Tag wiederholt. Nach 48 Stunden *in vitro*-Kultur wurden durchflusszytometrisch die GMP-Populationen isoliert und das Differenzierungspotential dieser Zellen in *colony-forming*-Assays überprüft.

4.2.1.12 Colony-Forming-Assays

Um die Differenzierungseigenschaften und die Selbsterneuerungskapazität von Granulozyten-Monozyten-Progenitoren zu untersuchen wurden B6-*Runx1*^{+/+}-, B6-*Runx1*^{Δ/Δ}- oder transduzierte B6-*Runx1*^{Δ/Δ}-Progenitorzellen immunhistochemisch angefärbt, durchflusszytometrisch anhand der Expression spezifischer Oberflächenantigene sortiert und in halbflüssigem Methylzellulosemedium kultiviert. Die halbflüssige Konsistenz der Methylzellulose ermöglicht es einzeln ausgesäten Progenitorzellen sich zu teilen und so Kolonien auszubilden. Für diese Versuche wurde eine Methylzellulose verwendet, die durch ihre Zytokinzusammensetzung die

myeloische Entwicklung unterstützt. Die durchflusszytometrisch sortierten Zellen wurden in IMDM/Glutamin/Pen/Strep aufgenommen, in einer Dichte von $2 - 5 \times 10^3$ Zellen pro ml in kleinen, unbeschichteten Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) ausgesät. Diese Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in einer humiden Umgebung nach Standardmethoden. Nach 7 Tagen *in vitro* Kultur wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien, sowie deren Linienzugehörigkeit (CFU-G, CFU-M, CFU-GM) bestimmt. Zur genaueren Analyse der unterschiedlichen Kolonien aus der Methylzellulose, wurden je ca. 5 Kolonien gleichen Phänotyps in 300 µl PBS gelöst, auf einen Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim mit Giemsa und May-Grünwald Lösung angefärbt (vgl.: 4.2.2.10). Weiterhin wurden das semi-solide Methylzellulosemedium durch Zugabe von 2 ml PBS verdünnt, in 15 ml PBS aufgenommen und 10 Minuten bei 300 x g sedimentiert. Die Zellen wurden erneute 10 Minuten bei 300 x g in 15 ml PBS gewaschen, bevor sie mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern angefärbt wurden (vgl.: 4.2.1.14).

4.2.1.13 Pappenheimfärbung

Alle angefertigten Blutausstriche und Zytospinpräparate wurden mit einer panoptischen Färbung nach Pappenheim angefärbt. In einem ersten Färbeschritt wurden die Objektträger 5 Minuten mit May-Grünwald-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bedeckt und diese anschließend mit deionisiertem Wasser abgespült. Nachfolgend wurde für 20 Minuten eine 1:25 in Wasser verdünnte Giemsa Lösung (AppliChem, Darmstadt) appliziert und ebenfalls mit deionisiertem Wasser gründlich abgewaschen. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit Roti-Mount (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt.

4.2.1.14 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen ermöglichen es Zellen nach Größe, Struktur und Fluoreszenz zu unterscheiden. Hierzu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln, mit hoher Geschwindigkeit an mehreren Lasern vorbeigeleitet. Das von den Zellen emittierte Licht gibt Aufschluss über deren Eigenschaften und wird von mehreren Detektoren analysiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel darstellt und von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Zusätzlich können Fluoreszenzen detektiert werden, die entweder von Reportergenen ausgehen oder mittels Antikörper an die Zellen gekoppelt wurden. Bei der gleichzeitigen Analyse von zwei oder mehr Fluoreszenzsignalen, wurde die automatische Kompensationsfunktion der Durchflusszytometer verwendet, um die Überlappung der Emissionsspektren zu berechnen und bei der Darstellung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Zur durchflusszytometrischen Analyse von Zellen oder Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese 5 min in PBS bei 300 x g gewaschen. Für Antikörperfärbungen wurden je 1 x 10^6 Zellen in einem Volumen von 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 0,2 - 0,5 µg fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper mindestens 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz mit PBS auf 1,5 ml aufgefüllt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 300 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.1.15 Durchflusszytometrische-Sortierung

In Durchflusszytometern mit Sortierfunktion wird der Flüssigkeitsstorm im Anschluss an die Detektion der Lichtbrechung und Fluoreszenzsignale durch Vibrationen der Fließzelle in Tropfen unterteilt. Die Tropfengröße wird dabei so gewählt, dass jeder Tropfen nur eine Zelle beinhält. Durch die elektrische Aufladung der Tropfen werden diese im dahinter geschalteten, elektrischen Feld abgelenkt und können so in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden. Die Vorbereitung von Zellen für den Sortiervorgang erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen FACS-Analysen. Nach dem Waschen der Zellen wurden je 3 – 4 x 10⁶ Zellen in 1 ml PBS/FCS/Pen/Strep resuspendiert und diese durch ein steriles Sieb filtriert. Die Sortierung erfolgte am BD FACS Aria. Zellen die weiter kultiviert werden sollten, wurden in Kulturmedium sortiert, gewaschen und anschließend entsprechend ihrer Zellzahl in Kulturmedium versetzt mit 0,5 mg/ml Ciprobay (Bayer Schering Pharma, Leverkusen) ausgesät. Die durchfluss-zytometrische Sortierung von Zellen für Genexpressionsstudien (Mikroarray, RNA-Extraktion) erfolgt unter Kühlung in vorgekühltes PBS.

4.2.1.16 Vorbereitung von Zellen für Genexpressionsanalyse

Genexpressionsanalysen wurden zum einen von B6-*Runx1*^{+/+} und B6-*Runx1*^{Δ/Δ} GMP-Fraktionen und zum anderen von B6- *Runx1*^{Δ/Δ}-RUNX1-ERt2 und B6-*Runx1*^{Δ/Δ}-Strep-ERt2 GMP-Fraktionen durchgeführt. Hierbei wurden die Knochenmarkzellen von 5 - 10 (Deletionsmodell) bzw. 3 - 6 Mäusen (Überexpressionsmodell) vereinigt, die Progenitorzellpopulationen angereichert und die GMP-Population unter Kühlung durchflusszytometrisch isoliert. Im Anschluss hieran wurden die Zellen durch Zentrifugieren 5 min bei 300 x g und 4°C pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Versand an Miltenyi Biotec wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation (NucleoSpin® RNA II; Agilent Technologies), Cy3-Markierung und Hybridisierung der RNA zum *Agilent Whole Mouse Genome Microarray* 4x44K one color (*Cy3*) wurden durch Miltenyi Biotec (Mönchengladbach) durchgeführt.

4.2.1.17 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Analyse der zellulären Lokalisation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in transduzierten Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei werden zuerst Antigene mittels eines primären Antikörpers detektiert, im zweiten Schritt erfolgt die Markierung durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, die Blockierung, wie auch die nachfolgenden Färbeschritte wurden in einer dunklen, mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden transduzierte SC-1 Fibroblasten auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von ~80% kultiviert und wie zuvor beschrieben mit 4-OHT oder Ethanol behandelt. Die so behandelten Zellen wurden vorsichtig mit PBS gespült und unter Schwenken für 10 Minuten in einer 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Um die Zellemembran zu permeabilisieren wurden die Präparate 10 Minuten in Permeabilisierungslösung inkubiert und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation in einer BSA-Lösung für 30 Minuten abgesättigt. Anschließend wurden 10 µg des Primärantikörpers auf die Zellen pipettiert und das benetzte Deckgläschen für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Färbung mit dem Primärantikörper wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten unter Schwenken in PBS/Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 200 µg des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für mindestens 30 Minuten analog zur Inkubation mit dem Primärantikörper. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in PBS/Tween entfernt und die Bindung der Antikörper durch inkubieren der Präparate für 10 Minuten in Fixierungslösung fixiert. Abschließend wurden die Deckgläschen erneut in PBS/Tween gespült, getrocknet und mit Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) eingebettet. Die Analyse der Präparate erfolgte am Konfokalmikroskop.

4.2.2 Tierexperimentelle Methoden

4.2.2.1 Identifikation transgener Mäuse

Allen Tiere der B6-*Runx1-VavCre* Zucht wurden 3 Wochen nach der Geburt eine Ohrmarkierung gesetzt und das Stanzenmaterial für die Genotypisierung genutzt. Die Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte mittels des *innuPREP DNA Mini Kits* (Analytik Jena, Jena). 2 µl DNA wurden für eine Standard-PCR mit den Primern cs507, cs508 und cs509 (binden an das gefloxte bzw. an das Wildtyp(wt)-Allel von *Runx1*) eingesetzt (Abb. 5;

vgl.:4.2.3.2) In den B6-*Runx1*^{Δ} Tiere führt die Amplifikation mittels der Primer cs508 und cs509 zu einem 382 bp großen PCR-Produkt. Das wt-Allel wird durch die Primer cs507 und cs508 amplifiziert, welches zu einem Fragment von 260 bp führt (Put*z*, *et al.*, 2006).



Abb. 5: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen zur Genotypisierung konditional *Runx1*-deletierter Mäuse. $Runx1^+$: die Primer cs508 und cs507 amplifizieren ein 260 bp Fragment. $Runx1^{ff}$: durch die Insertion der LoxP-Sequenz führt die Amplifikation mit cs508 und cs507 zu einem 325 bp Fragment. $Runx1^{ff}$: durch die Primer cs508 und cs509 wird ein 382 bp großes Fragment amplifiziert.

4.2.2.2 Fluorouracil-Behandlung von Spendermäusen

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Antimetabolit, der aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin bzw. Uracil anstelle derer in die Nukleinsäuren eingebaut wird. Es kommt zur Synthese fehlerhafter RNA und zur Hemmung die Protein-Biosynthese. Daher sind proliferierenden Zellen sensitiv für die Wirkung des 5-FUs, ruhende hämatopoetische Stammzellen jedoch nicht. Die 5-FU-Behandlung von Versuchstieren führt dazu, dass die reifen Zellen absterben, was wiederum eine Aktivierung der Stammzellen zur Folge hat (Radley und Scurfield, 1979; Spangrude et al., 1988; Lerner und Harrison, 1990). Zur Anreicherung früher hämatopoetischer Zellen wurden B6-*Runx1*^{ΔΔ} Spendermäusen 150 μg 5-FU pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach drei Tagen wurden die Knochenmarkzellen, wie zuvor beschrieben, steril entnommen (vgl. II.2.1.9).

4.2.2.3 Kultivierung von Stamm- und Progenitorzellen für Transplantationen

Die mit 5-FU behandelten B6-*Runx1*^{ΔΔ} Spendermäuse wurden nach einer Ethernarkose durch zervikale Dislokation getötet und in 80%-igem Ethanol semisteril gehalten. Unter einer Sterilwerkbank wurden Tibiae und Femora entnommen und das Knochenmark durch Durch-

spülen mit einer 1 ml Spritze mit einer 23 Gauge-Kanüle in IMDM/FCS/Glutamin ausgespült. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen vereinzelt und Erythrozyten durch die Zugabe von 1 ml Lysepuffer (Pharmalyse, 10x, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) lysiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 15 ml PBS hinzugefügt und die Zellen 5 Minuten bei 300 x g gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen pro ml in SFEM aufgenommen und 3 ml Zellsuspension pro Loch in einer unbeschichteten Kulturplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 72 Stunden, bevor es zur Transduktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen kam.

4.2.2.4 Transduktion isolierter und kultivierter Stamm- und Progenitorzellen

Die Transduktion der Stamm- und Progenitorzellen nach der 5-FU-Behandlung erfolgte wie in 4.2.1.11 beschrieben. 24 Stunden nach der zweiten Transduktion wurden die Zellen gezählt und für die Transplantation vorbereitet.

4.2.2.5 Transplantation transduzierter Stamm- und Progenitorzellen

Um das Anwachsen der transduzierten Stammzellen in den C57BL/6J-Ly5.1 Empfängertieren zu ermöglichen wurden diese zunächst letal, mit einer Dosis von 9 Gray, in einer offenen Cäsium-137-Strahlungsquelle (Heinrich-Pette-Institut) bestrahlt. Die Transplantation erfolgte 16 – 18 Stunden nach der Bestrahlung intravenös über die Schwanzvene. Hierzu wurden die transduzierten Zellen zweimal in IMDM ohne Zusätze gewaschen (5 min, 300 x g) und anschließend 2,5 – 3 x 10⁶ transduzierte Knochenmarkzellen sowie 5 x 10⁴ Milzzellen einer C57BL/6J-Ly5.1-Maus in 300 µL IMDM ohne Zusätze suspendiert und injiziert. Für die nachfolgenden 21 Tage wurde dem Trinkwasser der transplantierten Mäuse zur Infektionsprophylaxe Baytril (Wirkstoff Enrofloxacin, Bayer Health Care, Leverkusen) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugesetzt.

4.2.2.6 Tamoxifenbehandlung in vivo

Damit es *in vivo* zu einer transkriptionalen Regulation durch die transduzierten RUNX1(^{R135G})-ERt2-Fusionsproteine kommt, wurde den Tieren Tamoxifen appliziert.

Tiere, die mit transduzierten *Runx1*^{∆/∆}-Zellen transplantiert wurden um Progenitorpopulationen für Genexpressionsstudien zu isolieren wurden 7 Wochen nach der Transplantation über einen Zeitraum von einer Woche mit tamoxifenhaltigen Pellets (LASCRdiet CreActive TAM400, 400 mg/kg Tamoxifen-Citrate, LASvendi, Soest) gefüttert. Nach 4 Tagen oraler Tamoxifenapplikation wurde täglich zusätzlich jeweils Tamoxifen in einer Dosierung von 49,5 µg pro Gramm Körpergewicht interperitoneal injiziert. Hierzu wurde eine 66 mg/ml Tamoxifenlösung in abs. Ethanol hergestellt, mehrfach sonifiziert, und 1:10 in Sonnenblumenöl verdünnt. Kontrolltieren wurden die entsprechende Menge Ethanol, verdünnt in Sonnenblumenöl injiziert.

Anderen Versuchstieren hingegen, anhand derer das Zusammenwirken von FLT3-ITD und RUNX1 bzw. RUNX1^{R135G} untersucht werden sollten, wurde ab Woche 3 nach der Transplantation bis zur Analyse der Tiere tamoxifenhaltiges Futter verabreicht.

4.2.2.7 Analyse erkrankter Tiere

Tiere, die mit retroviral veränderten Knochenmarkzellen transplantiert waren, wurden regelmäßig auf Krankheitssymtome, wie buckelige Haltung, Hecheln/Atemnot, struppiges Fell, Blutarmut, oder das Auftreten vergrößerter Organe hin untersucht. Traten eindeutige Krankheitssymtome auf, so wurden die Tiere zunächst in eine Ethernarkose versetzt und eine retroorbitale Blutentnahme in ein EDTA-haltiges Kapillarröhrchen (Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) vorgenommen. Anschließend wurden die Tiere durch eine zervikale Dislokation getötet. Durch Besprühen mit Ethanol wurde der Körper semisterilisiert.

Die Obduktion kranker Tiere begann mit einem doppelten Y-Schnitt der Dermis zur Freilegung von Hal, Thorax und Peritoneum, sodass die peripheren, axialen und zervikalen Lymphknoten gut beurteilt werden konnten. Nach Öffnen des Peritoneums konnten Auffälligkeiten an Darm und mesenterialen Lymphknoten ermittelt werden. Anschließend wurden Milz, Nieren, Leber sowie die lumbalen Lymphknoten untersucht. Die Milz wurde routinemäßig entnommen und gewogen. Teile von Leber und Milz wurden in IMDM-Medium überführt, um durchflusszytometrische Analysen (vgl.: 4.2.1.14) durchführen zu können. Zudem wurde eine Niere, sowie ein Leberlappen und ein Teil der Milz für spätere histologische Analysen in 4%-iger Formaldehydlösung fixiert (vgl.: 4.2.2.10). Um zu einem späteren Zeitpunkt gegebenenfalls DNA oder RNA (vgl.: 4.2.3.1) isolieren zu können, wurden Teile von Leber und Milz in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach Eröffnen des Thorax wurden Herz, Lunge und Thymus sowie die mediastinalen und thymusassoziierten Lymphknoten untersucht und gegebenenfalls schockgefroren oder für durchflusszytometrische Analyse aufbewahrt. Zur Knochenmarkisolierung wurden Tibiae und Femora der Maus präpariert und das Knochenmark wie oben beschrieben, isoliert. Für eine spätere histologische Aufarbeitung des Knochenmarks wurde das Sternum entnommen und in 4 ml CALfix-Lösung bei 4°C aufbewahrt. Die Kadaver der getöteten Mause wurden zentral entsorgt.

4.2.2.8 Analyse der Blutparameter

Alle Blutparameter wurden mit Hilfe des Hemavet 950FS (Drew Scientific Inc., Oxford, Connecticut) analysiert. Vor der Analyse erfolgte die Messung des Leerwertes, sowie eines von der Firma bereitgestellten Kontrollreagenz. Für diese Analyse wurden 20 µl Blut benötigt. Für die morphologische Bewertung des peripheren Blutes wurden von allen Mäusen Blutausstriche erstellt. Hierzu wurden 2 µL Blut mittels im 45° Grad Winkel gehaltenen Objektträgers entlang der Längsachse gleichmäßig auf einem weiteren Objektträger ausgestrichen. Die Ausstriche wurden über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte eine Färbung nach Pappenheim.

4.2.2.9 Vorbereitung der Organe zur durchflusszytometrischen Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse entnommener Organe wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. In IMDM aufgenomme Teile von Milz, Leber und Thymus wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Drahtsieb mit einer Maschenweite von 160 µm gepresst und diese mehrfach mit Kulturmedium gespült. Die vereinzelten Zellen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 300 x g sedimentiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Resuspendieren der Zellen in Lysepuffer (BD PharmLyse, Becton Dickinson, Heidelberg). Nach mehrfachem Invertieren wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (5 Minuten bei 300 x g) sedimentiert und für die anschließende Färbung mit floureszenz-gekoppelten Antikörpern der Zellzahl entsprechend in PBS resuspendiert. Die Erythrozyten des submandibulär entnommenen Bluts wurde vor der Antikörperfärbung ebenfalls lysiert, Knochenmarkzellen wurden lediglich durch wiederholtes Ausziehen in einer Spritze vereinzelt. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden alle Einzelzellsuspensionen durch sterile Siebaufsätze in Polystyrenröhrchen filtriert.

4.2.2.10 Histologische Methoden

Die Aufarbeitung sowie Färbung der histologischen Proben wurde freundlicherweise von G. Pilnitz-Stolze (Abteilung Tumorvirologie, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt. Die folgenden Arbeitsanleitungen geben nur die Prinzipien der jeweiligen histologischen Aufbereitung beziehungsweise Markierung der nachzuweisenden Gewebestrukturen wieder. Die aus den Versuchstieren entnommenen, fixierten, Sterna wurden vor der Einbettung in Paraffin in CALless-Lösung dekalzifiziert. Präparierte, in 4%iger Formaldehydlösung fixierte Organe wurden in Einbettkassetten (DiaPath, München) überführt, mit 55%igem Ethanol behandelt, stufenweise entwässert (Vakuumgewebeinfiltrationsautomat Leica ASP300, Nussloch) und schließlich in Paraffinblöcke eingebettet (Paraffinausgießstation Leica EG1160, Nussloch). Mittels eines Mikrotoms wurden $3 - 4 \mu m$ dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost/Plus

Objektträger (Assistent, Sodenheim) überführt. Es folgte ein Trocknungsschritt über Nacht bei 37°C bevor die Färbung der Gewebeschnitte mit Hamatoxilin/Eosin bzw. nach Pappenheim erfolgte.

4.2.3 Nukleinsäure-analytische Methoden

4.2.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus primären Zellen

Die Isolation von RNA und genomischer DNA (gDNA) aus sortierten Progenitor- oder Milzzellen erfolgte mittels des *peqGOLD TriFast Kits* (Peqlab). $1 - 4 \times 10^5$ Progenitorzellen wurden 5 Minuten bei 300 x g und 4°C sedimentiert und in 500 µl peqGOLD TriFast resuspendiert. Zur Isolation von Nukleinsäuren aus Geweben wurden, in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Organe (~100 mg), in 1 ml peqGOLD TriFast aufgenommen und mittels eines elektrischen Homogenisators (Polytron-Aggregate, Kinematica, Luzern, Schweiz) auf Stufe 3 für eine Minute zerkleinert. Die weitere Extraktion der Nukleinsäuren (RNA und DNA) erfolgte nach den Herstellerangaben des *peqGOLD TriFast Kits*.

4.2.3.2 Excision-PCR

Die spezifische Amplifikation von gDNA erfolgte durch die PCR-Methode (Saiki *et al.*, 1988) unter Verwendung des *Taq Polymerase Core Kits* in einem Volumen von 20 µl. Dazu wurden 200 ng gDNA mit 0,4 µl dNTPs (je 10 mM), 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer, jeweils 0,2 µM *forward-* und *reverse-*Primern, 4 µl Q-Solution sowie mit 2 U *Taq-*Polymerase versetzt. Das PCR-Programm entsprach dem Standardprogramm (initiale Denaturierung (5 min, 95°C), 35 Zyklen Denaturierung (30 sec, 94°C), Annealing (30 sec, 55°C) und Elongation (60 sec, 72°C), gefolgt von einer finalen Elongation (5 min, 72°C)).

4.2.3.3 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der zellulären RNA-Transkripte in cDNA wurde 1 μ g der isolierten RNA für eine reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Diese erfolgte unter Verwendung eines *Random*-Primers (Primer random p(dN)₆, Roche Applied Science, Mannheim) mit der AMV-Reversen Transkriptase (New, England Biolabs, Frankfurt) nach dem Herstellerprotokoll.

4.2.3.4 Quantitative Real-time-PCR

Mit der quantiativen *real-time* PCR (q*RT*-PCR) kann die relative Menge spezifischer Transkripte in verschiedenen Proben gemessen und miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit wurden Transkripte mittels des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR-Green* detektiert. Dieser lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein und emittiert dann ein starkes Fluoreszenzsignal, sodass bei steigenden DNA-Mengen während der PCR auch das Fluoreszenzsignal zunimmt.

Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge wurde neben den zu analysierenden Proben stets eine Verdünnungsreihe einer unbehandelten Probe gemessen. Mittels der hieraus resultierenden Standardreihe, konnte die relative Konzentration des Amplifikats in den Proben bestimmt werden. Die Normalisierung der Messergebnisse erfolgte anhand der Expression eines Referenzgenes (*housekeeping gene*), das in allen Zellen gleich stark exprimiert und mit derselben Effizienz amplifiziert wird. Die relative Transkriptmenge des Zielgens ergab sich aus folgender Formel:

normalisiertes Ergebnis =

realtive Konz.Zielgen

relative Konz.Referenzgen

Die in dieser Arbeit durchgeführten q*RT*-PCR-Analysen dienten ausschließlich der Verifizierung der durch Miltenyi Biotec ermittelten Mikroarray-Daten und wurden mit dem *Light Cycler 480 SYBER Green I Master Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Referenzgen diente die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*). Die Amplifikation der Proben erfolgte in zwei unabhängigen Läufen jeweils als Duplikat. Hierzu wurde ein Standardprogramm (initiale Denaturierung (10 min, 95°C), 40 Zyklen - Denaturierung (10 sec, 95°C), Annealing (10 sec, 60-62°C) und Elongation (10 sec, 72°C), gefolgt von einer finalen Denaturierung (95°C \rightarrow 37°C) genutzt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2 aufgeführt.

4.2.3.5 Southern Blot-Analyse

Mittels Southern Blot-Analysen ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen innerhalb des Genoms zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt, um die Integration retroviraler Vektoren in dem Genom erkrankter Mäuse zu überprüfen. Hierbei wird die genomische DNA der Zellen restringiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, alkalisch denaturiert und auf eine Membran transferiert. Durch die Bindung einer radioaktiv markierten Sonde können spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Als Sonden verwendete DNA-Fragmente wurden aus entsprechenden Vektoren mittels Restriktionsverdau isoliert und mit Hilfe des *DecaLabel*[™] *DNA Labeling Kit*s (Fermentas, St. Leon-Rot) radioaktiv markiert. Anschließend wurden diese über Sephacryl-Säulen (*MobiSpin S300*, MoBiTec, Göttingen) durch Zentrifugation (1 min, 800 × g) aufgereinigt. Genomische DNA wurde enzymatisch restringiert (EcoRV; HindIII, Life Technologies, Darmstadt) und anschließend einer Größentrennung mittels eines 0,8%-igen Agarosegels unterzogen. Als

Größenstandard wurden 2×10^5 cmp einer mit HindIII gespaltenen λ -Phagen-DNA (Life Technologies, Dramstadt) aufgetragen, die analog zur Sonde radioaktiv markiert und aufgereinigt wurde. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einer konstanten Spannung von 25 V. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel zunächst 30 min in Lösung I und anschließend 30 min in Lösung II geschwenkt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (0,45 µm Biodyne B Transfer Membran, PALL, Pensacola, USA) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur im Kapillarblotverfahren unter Verwendung von 10 x SSC-Puffer. Am nachfolgenden Tag wurde die Membran je 30 Sekunden in Lösung I und Lösung IIb geschwenkt und anschließend durch eine Inkubation für 2 Stunden bei 80°C mit der Membran vernetzt. Zur Prähybridisierung der Membran wurde diese eine Stunde bei 55°C in 10 ml Hybridisierungspuffer in einem Rotator (Perfect Blot, Peglab, Erlangen) inkubiert. Mindestens 1,5 × 10⁷ cpm der radioaktiv markierten Sonde wurden zunächst 5 Minuten bei 90°C denaturiert und anschließend über Nacht bei 55°C mit der Membran hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran kurz mit Waschlösung I gespült, in Waschlösung II überführt und für eine Stunde bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingewickelt, und die radioaktive Sonde durch Auflegen eines Röntgenfilms (RP New Medical X-Ray screen film blue sensitive, CEA, Hamburg) detektiert. Für die Entwicklung der Filme wurde eine Entwicklermaschine (AGFA, Classis EOS, Siemens, Erlangen) verwendet.

4.2.3.6 Chromatinimmunpräzipitation-DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq)

Mittels Chromatinimmunpräzipitationen wurden genomweit die Runx1 DNA-Bindungsstellen in hämatopoetischen Progenitoren analysiert. Hierzu wurden entweder unbehandelte FDC-P1-Zellen oder mit RUNX1-ERt2-exprimierenden Retroviren transduzierte FDC-P1 Zellen verwendet. Transduzierte Zellen wurden vor der Analyse 48 Stunden mit 1 μ M 4-OHT behandelt. Die Vernetzung von Proteinen und Chromatin erfolgte durch 1%iges Formaldehyd. Anschließend wurden die Zellen lysiert, das Chromatin isoliert und durch Sonifikation in 200-500 bp große Fragmente geschert. Das Material von 1 x 10⁷ Zellen wurde mittels Protein-G-Agarose *beads* gereinigt und für die Chromatinimmunpräzipitation wurde entweder ein Runx1spezifischer Antikörper oder ein unspezifisches IgG verwendet. Protein-DNA-Komplexe wurden durch Protein G Sepharose 4 Fast Flow-Agarosebeats (GE Healthcare, Freiburg) gebunden und nach Herstellerabgaben eluiert.

An die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des NEXTflex[™] ChIP Seq-Kits Adaptermoleküle ligiert. DNA-Fragmente einer Größe von 200 - 400 bp wurden mittels PippinPrep isoliert und durch PCR amplifiziert. Abschließend wurden die fertigen Sequenzierbibliotheken quantifiziert (Qubit), sowie die Fragmentgröße mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und einem *High Sensitivity DNA Kit* bestimmt. Mehrere Sequenzierbibliotheken wurden vereinigt und im Genome Analyzer IIx sequenziert. Die erhaltenen *reads* der Runx1-Immunpräzipitation und der IgG-Kontrolle wurden jeweils mit dem Programm *Bowtie* mit dem murinen Genom (mm9/UCSC) aligniert. Um Runx1 gebundene Regionen zu identifizieren, wurde die Software MACS verwendet. Putativ regulierte Gene wurden mittels der Annotationen der UCSC Genom Datenbank bestimmt. Die MEME-Software wurde genutzt um *de novo* DNA Bindungsmotive zu identifizieren. Hierzu wurde der *summit* (DNA-Abschnitt mit der höchsten *Coverage*) 500 zufällig ausgewählter *peaks* in jede Richtung um 75 bp erweitert und dieser Bereich auf überrepräsentierte Motive hin untersucht. Detektierte Motive wurden mit Hilfe der TOMTOM-Software gegen die Datenbanken *JASPER Core 2009 vertebrates* und *UniPROBE-mouse* abgeglichen.

4.2.3.7 RNA-Sequenzierung

Um das Differenzierungsstadium der Blasten leukämischer Mäuse analysieren zu können, wurden mittels des *peqGOLD TriFast Kits* RNA aus der Milz einer erkrankten Maus extrahiert. 1µg dieser RNA wurde verwendet, um mittels des *TrueSeq RNA Kits* (Illumina, San Diego, CA, USA) eine cDNA-Bibliothek herzustellen. Hierfür wurde zunächst die mRNA mittels oligo(dT) *beads* isoliert, fragmentiert und revers transkribiert. An die cDNA Fragmente wurden Adaptermoleküle ligiert und die Fragmente durch PCR amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Die erhaltenen *reads* wurden mit dem Programm Bowtie II mit der murinen cDNA (mm9/UCSC) aligniert. Die Anzahl der mit einem bestimmten Transkript alignierten *reads* wurde jeweils über die Anzahl aller alignierten Reads und die Länge des entsprechenden Transkripts normalisiert (FPKM; *fragments per kilobase per million sequenced reads*).

4.2.4 Protein-analytische Methoden

4.2.4.1 Zelllyse und Probenaufbereitung

Zum Nachweis der Überexpression des RUNX-ERt2-Fusionsproteins in FDC-P1-Zellen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Zelllyse erfolgte mit saurer 10% iger TCA-Lösung, um die während der Proteinisolation freigesetzten Proteasen möglichst inaktiv zu halten. Neben dem Zellaufschluss bewirkt diese Säure eine sofortige Denaturierung und Fällung der freigesetzten Proteine. Alle Isolationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen geerntet und in 450 µl einer kalten, 15 mM Natriumchlorid-Lösung resuspendiert. Zur Fällung der Proteine wurde 1/10 Volumen 100% TCA zugefügt und das Präzipitat für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes für 5 min bei 16.000 x g und 4°C

wurde das gefällte Proteinpellet in 160 µl 2 x Probenpuffer aufgenommen, zur Neutralisation des restlichen TCA mit 40 µl 1 M Tris-Lösung versetzt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Das zurückgebliebene Präzipitat wurde schließlich durch zweifaches Sonifizieren bei einem Puls von 40-50% (Bandelin Sonoplus HD 270, Bandelin, Berlin) gelöst.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 1:10 Verdünnungen der Lysate in 2 x SDS-Probenpuffer hergestellt und diese anschließend mit dem *BioRad DC-Protein Assay* nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich eine BSA-Eichreihe in 2 x SDS-Probenpuffer mit bekannten BSA-Konzentrationen vermessen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 620 nm im ELISA-Reader. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert, unmittelbar vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde 50 µg Proteinlysat mit einer 1:3 Mischung aus Dithiothreitol (DTT; zur Oxidation von Disulfidbrucken und weiterer Denaturierung der Proteine) und 3 x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht.

4.2.4.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die isolierten Proteine wurden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE (*Sodium Dodecy/Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) aufgetrennt. Im Sammelgel werden die Proteine aufgrund eines neutralen pH-Werts aufkonzentriert, im basischen Trenngel erfolgt schließlich die Auftrennung entsprechend des Molekulargewichts. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Vertikalelektrophoresekammer (SE 260, Hoefer Scientific, San Francisco, USA) bei einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 2 h. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde ein gefärbter Größenstandard (Spectra Multicolor Broad Range Prtoein Lasser, Thermo Sientific, Darmstadt) mitgeführt.

4.2.4.3 Western Blot und immunologische Detektion

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung können Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels einer Immundetektion identifiziert werden (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981).

Die verwendete PVDF-Membran Membran (Immobilon Transfer Membrans, Millipore, Schwalbach) wurde zunächst 15 Sekunden in Methanol aktiviert und nach Abspülen mit deionisertem Wassser mindesten 2 Minuten in Transferpuffer äqulibriert. Anschließend wurden die Proteine 60 Minuten bei konstanten 100 V unter Kühlung im Tankblot-Verfahren (Mini-Trans Blot Cell, Bio-Rad, München) auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurden die proteingebundene Membran eine Stunde in Blockierungslösung geschwenkt um unspezifische Bindestellen abzusättigen und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Primärantiköper inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS-Tween gewaschen und danach eine Stunde mit einem zur Bindung an den Erstantikörper geeigneten Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran für 10 Minuten in T-TBS entfernt. Antiköperbindungen wurden schließlich mittels einer Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des *Amersham ECL Western Blotting Detection Kits* (GE Healthcare, Freiburg) detektiert.

Zur Weiterverwendung der Membran wurde diese erneut in T-TBS gewaschen und vor Zugabe eines weiteren Primärantikörpers für mindestens 30 Minuten in Block-Puffer inkubiert.

5 Ergebnisse

5.1 Welche Funktion hat Runx1 in der myeloischen Differenzierung?

RUNX1 ist eines der am häufigsten deregulierten Gene in akuten myeloischen Leukämien. Neben der in 15-20% aller AMLs auftretenden Translokation t(8;21), weisen auch AMLs mit minimalen Differenzierungszeichen (Subtyp M0) mit einer hohen Inzidenz von 24%, eine Mutation im *RUNX1*-Locus auf. Im Mausmodell konnte die Bedeutung von Runx1 während der Myelopoese bestätigt werden. So führt die konditionale Deletion von Runx1 zu einer Myeloproliferation, sowie zu einem Defekt der Megakaryozytendifferenzierung (Ichikawa, *et al.*, 2004; Growney, *et al.*, 2005; Putz, *et al.*, 2006).

Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte im ersten Teil dieser Arbeit die Funktion von Runx1 im myeloischen Progenitorkompartiment analysiert werden. Hierzu wurde ein konditionales *Runx1* Knockout-Mausmodell (B6-*Runx1*^{fl/fl}-*Vavcre*) verwendet in dem das Exon 4 des *Runx1*-Genes von lox-P-Sequenzen flankiert ist (gefloxt). Durch die zusätzliche Expression der transgenen *Cre*-Rekombinase kommt es zum Ausschneiden des gefloxten Exons, was wiederum eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hat, sodass kein funktionales Runx1-Protein gebildet wird (Putz, *et al.*, 2006). Da die Rekombinase unter der Kontrolle des *Vav*-Promotors steht, der nahezu ausschließlich in adulten hämatopoetischen Zellen aktiv ist, erfolgt eine gewebsspezifische Deletion des Exons. Im Folgenden werden die konditionalen *Runx1* knockout-Mäuse als *Runx1*^{Δ/Δ} bezeichnet, während Kontrollmäuse mit *Runx1*^{+/+} abgekürzt werden. In diesen Kontrolltieren ist das Exon 4 des *Runx1* Gens nicht gefloxt, die Mäuse sind jedoch transgen für die *Cre*-Rekombinase.

5.1.1 Der Verlust von Runx1 führt zu einer Vermehrung der myeloischen Progenitorzellen

In einem ersten Experiment wurde analysiert, welche Bedeutung Runx1 in den einzelnen Progenitorpopulationen hat. Dies ist von großer Bedeutung, da hämatopoetische Stammzellen und frühe myeloische Progenitorzellen die Zielzellen für transformierende, Leukämieinduzierende Mutationen sind.

Hierzu wurden Knochenmarkzellen aus konditionalen $Runx1^{\Delta\Delta}$ Mäusen, sowie aus $Runx1^{+/+}$ Mäusen isoliert und die Progenitorzellen angereichert. Diese wurden anschließend mit spezifischen, fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker unterschiedlicher myeloischer Progenitorpopulationen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Abb. 6A ist beispielhaft eine durchflusszytometrische Analyse einer $Runx1^{+/+}$ und einer

Runx1^{∆∆} Maus dargestellt, anhand derer alle frühen myeloiden Differenzierungsstadien unterschieden werden konnten (Abb. 6A+B). Bemerkenswert waren die unterschiedlichen Expressionsniveaus der Oberflächenantigene CD16/32 und CD150, bei Verwendung gleicher Parameter für die Analysen. Dies könnte auf eine Beeinträchtigung der Differenzierung durch die Deletion von Runx1 hinweisen, oder dadurch begründet sein, dass die Expression dieser membranständigen Proteine durch Runx1 reguliert wird.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen ergab, dass der Verlust von Runx1 zu einer deutlichen Vergrößerung des gesamten myeloischen Progenitorkompartiments führte. Alle myeloischen Progenitoren (MP, Myeloid-Progenitors) sind durch die Expression des Kit-Rezeptoren gekennzeichnet. Die Gesamtzellzahl der Kit-exprimierenden Zellen lag in Runx1defizienten Mäusen bei 9,9 x10⁵. Im Vergleich hierzu exprimierten nur 2,5 x 10⁵ Progenitorzellen im Knochenmark der Kontrollmäuse das Oberflächenantigen Kit (Abb. 6C). Die ersten, sich im Verlauf der Differenzierung entwickelnden, myeloisch geprägten Progenitoren sind die Common-Myeloid-Progenitors (CMPs). Diese stellen jedoch vermutlich nur ein transientes Entwicklungsstadium dar und konnten anhand der hier analysierten Oberflächenantigene nicht differenziert werden. Diese multipotenten Progenitoren differenzieren entweder zu Granulozyten-Monozyten-Progenitoren (GMP), deren Gesamtzellzahl in den Runx1-defizienten Mäusen um den Faktor 2,2 erhöht war, oder zu Megakaryozyten-Erythrozyte-Progenitoren (MegE), die eine 5-fache Erhöhung zeigten. Die Entwicklung reifer Megakaryozyten und Erythrozyten erfolgt über das Zwischenstadium des megakaryozytären (MegP) bzw. erythroiden Progenitors (EryP). Während erstere in den *Runx1^{MA}* Mäusen im Durchschnitt um den Faktor 13,6 erhöht waren, ergab sich für die Progenitoren der Erythrozyten eine 3-fache Erhöhung (Abb. 6C+D).

Zusammengefasst zeigte diese Analyse, dass der Verlust von Runx1 *in vivo* eine Expansion des myeloischen Progenitorkompartiments im Knochenmark zur Folge hat. Hierbei waren sowohl die Granulozyten-Monozyten-Progenitoren, als auch die Eyrthrozyten-Megakaryozyten-Progenitoren signifikant vermehrt. Ferner deutet die verminderte Expression myeloischer Oberflächenmarker in Runx1-deletierten myeloischen Progenitoren, verglichen mit Kontrollzellen, entweder auf einen Beeinflussung der normalen Differenzierung dieser Zellen hin, oder aber auf eine Regulation dieser Proteine durch Runx1 hin.



Abb. 6: Die Deletion von Runx1 führt zu einer Expansion des myeloischen Progenitorkompartiments. A) Strategie zur Detektion von MP (lin⁻, sca⁻, kit⁺), MEP (CD41⁻, CD150⁺, CD16/32⁻), GMP (CD41⁻, CD150⁻, CD16/32⁺), EryP (CD41⁻, CD16/32^{neg/lo}, CD105⁺) und MegP (CD150⁺, CD41⁺). Dargestellt sind exemplarisch die Analysen angereicherter, sca-negativer Progenitoren einer *Runx1^{+/+}* und einer *Runx1^{-//-}* Maus. B) Schematische Darstellung der frühen myeloischen Differenzierung, beginnend mit der Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ). C) Quantifizierung der einzelnen, myeloischen Progenitorpopulationen in *Runx1^{+/+}* und *Runx1^{-//-}* Mäusen. Die absolute Zellzahl der in A) charakterisierten Populationen ist für jede analysierte Maus (zwei Femora) als ein Punkt dargestellt, der Mittelwert für die angegebene Stichprobengröße (n) mit Standardfehler ist als Balken abgebildet. D) Relative Quantifizierung der Expansion myeloischer Progenitor in *Runx1^{-/-/-}* Mäusen. *Runx1^{-/-/-}* Mäusen zeigten relative zu *Runx1^{+/+}* Mäuse eine Expansion aller analysierten Progenitorstadien. HSZ: hämatopoetische Stammzelle; MPP: multipotenter Progenitor; CMP: *Common myeloid progenitor*, GMP: Granulozyten-Monozyten-Progenitor; MEP: Megakaryozyten-Eryhtrozyten-Progenitor; EryP: Erythrozyten-Progenitor; MegP: Megakaryozyten Progenitor; CLP: *Common lymphoid progenitor*

5.1.2 Charakterisierung von Granulozyten-Monozyten-Progenitoren mit und ohne Runx1

Erste Analysen des Knochenmarks Runx1-exprimierender und Runx1-defizienter Mäuse haben gezeigt, dass der Verlust von Runx1 eine Expansion aller Progenitorpopulationen zur Folge hat. *RUNX1*-Mutationen treten allerdings mit einer hohen Inzidenz bei AML-M0 Patienten auf, einer Leukämieform, bei der die Differenzierung der frühen Myeloblasten in reife Granulozyten und Monozyten blockiert ist. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung von Runx1 in frühen myeloischen Zellen, den Granulozyten-Monozyten-Progenitoren, detaillierter analysiert.

5.1.2.1 Runx1 ist für die Regulation der Selbsterneuerungskapazität und Differenzierung myeloischer Progenitoren wichtig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Deletion von Runx1 zu einer Vergrößerung der GMP-Population führt, wurde anschließend die Differenzierungskapazität dieser Progenitorzellen mittels eines *colony-forming-assays* näher untersucht. Hierzu wurden zunächst Knochenmarkzellen aus *Runx1^{+/+}* und *Runx1^{-//-}* Mäusen entnommen, die frühen Progenitorzellen angereichert und die GMP-Fraktion durchflusszytometrisch isoliert. Anschließend wurden 2 x 10⁴ dieser Zellen in einem Methylzellulosemedium ausplattiert, welches die myeloische Entwicklung der Zellen unterstützt. Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der entstandenen granulozytären (*Colonie-Forming-Unit-granulocyte*; CFU-G), monozytären (*Colonie-Forming-Unit-granulocyte*; CFU-G), monozytären (*Colonie-Forming-Unit-granulocyte*; CFU-G), Es wurden drei unabhängige Experimente jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Grundsätzlich konnte in allen $Runx1^{\Delta\Delta}$ Ansätzen eine um mehr als 25% erhöhte Koloneinzahl gegenüber den $Runx1^{+/+}$ Ansätzen beobachtet werden. Während die Kultivierung von 2 x 10⁴ $Runx1^{\Delta\Delta}$ GMP-Zellen durchschnittlich zur Bildung von 167 Kolonien führte und somit einer Klonierungsfrequenz von 0,835% (1/120) führt, lag die mittlere Kolonienzahl in den Runx1-exprimierenden Ansätzen nur bei 123 Kolonien. Dieses entspricht einer Klonierungsfrequenz von 0,615% (1/163) (Abb. 7B). Die nähere zytologische Analyse der einzelnen Kolonien zeigte, dass alle drei Kolonietypen (CFU-G, CFU-M, CFU-GM) in den Runx1-exprimierenden Kontrollansätzen mit etwa gleicher Häufigkeit auftraten. Hingegen konnten in den Runx1-defizienten Ansätzen nur zwei Typen von Kolonien unterschieden werden, CFU-G* und CFU-GM*. Diese wiesen ein blastenartiges Erscheinungsbild auf und lagen im Verhältnis 1:2 vor (Abb. 7C).

Zur weiteren Charakterisierung der Kolonien wurden Zytospins der suspendierten Zellen unterschiedlicher Kolonientypen angefertigt. Während die granulozytären Kolonien (CFU-G) *Runx1*^{+/+} Ansätze fast ausschließlich aus terminal differenzierten, segmentkernigen

Granulozyten bestanden, zeigten Runx1-defiziente granulozytäre Kolnonien (CFU-G*) eine deutliche Linksverschiebung der Granulopoese (Abb. 7 D, links). Gekennzeichnet war diese durch das vermehrte Auftreten von Myeloblasten und Myelozyten innerhalb der Kolonie. Auch die gemischten CFU-GM*-Kolonien der $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Kulturen wiesen einen geringeren Differenzierungsgrad auf als die gemischten, $Runx1^{+/+}$ Kolonien (CFU-GM). So waren in den $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -Kulturen keine reifen Makrophagen vorhanden, während diese in den Kontrollkulturen deutlich zu erkennen waren (Abb. 7D). Neben der zytologischen Analyse erfolgte zusätzlich eine Färbung aller Zellen aus den Methylzellulosekulturen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD11b und Gr1, deren Expression mit zunehmender Differenzierung myeloischer Zellen ansteigt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass 76% der $Runx1^{+/+}$ Zellen stark positiv für die Marker CD11b und Gr1 waren, wohingegen die Gr1-Expression in den $Runx1^{-M}$ Zellen reduziert war, sodass nur 48% der Zellen beide Marker in hohem Maße exprimierten (Abb. 7E).

Um zu bestätigen, dass in dem analysierten Knochenmarkkompartiment der $Runx1^{\Delta\Delta}$ Mäuse das Ausschneiden des gefloxten Runx1-Allels stattgefunden hatte, wurden Granulozyten-Monozyten-Progenitor durchflusszytometrisch sortiert, die genomische DNA dieser Zellen isoliert und mit Hilfe einer Multiprimer-PCR analysiert. Ein Agarosegel der amplifizierten DNA-Fragmente ist in Abb. 7F beispielhaft dargestellt und bestätigt die erfolgreiche Deletion des Exons 4.

In der Summe konnten in diesen *in vitro*-Differenzierungsversuchen zwei wichtige Eigenschaften Runx1-defizienter GMPs beschrieben werden. Zum einen deutet das erhöhte Potential zur Kolonienbildung auf eine gesteigerte Selbsterhaltungskapazität der Runx1-defizienten Zellen hin. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von Runx1 zu einer Beeinträchtigung der myeloischen Differenzierung führt, welches durch die fehlende Ausreifung sowohl granulozytärer, als auch monozytärer Zellen gekennzeichnet ist. Allerdings deutet das völlige Fehlen monozytärer Kolonien (CFU-M) in den Runx1-defizieten Kulturen darauf hin, dass die monozytäre Reifung durch die Deletion von Runx1 stärker beeinträchtigt wird als die granulozytäre Differenzierung.



Abb. 7: Der Verlust von Runx1 beeinträchtigt die myeloische Differenzierung. A)Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Aus dem Knochenmark $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{-/-}$ Mäusen wurde die GMP-Population isoliert und in Methylzellulosemedium komplettiert mit SCF, IL3, IL6 und Epo ausgesät. **B)** Quantifizierung der Gesamtkolonienzahl 7 Tage nach Ausplattieren von 2x10⁴ GMP-Zellen in Methylzellulose. Dargestellt sind die Gesamtkolonienzahlen zweier unabhängiger, in Triplikaten durchgeführten Experimente (•, •). In allen $Runx1^{-//-}$ Kulturen war die Gesamtkolonienzahl leicht erhöht. **C)** Phänotypische Charakterisierung der in Methylzellulose entstandenen Kolonien. In $Runx1^{-//-}$ Kulturen waren keine typischen CFU-GM, CFU-G und CFU-M erkennbar. Stattdessen traten zwei blastenartigen Kolonientypen (CFU-GM* und CFU-G*) auf. Gezeigt sind die Analysen zweier, unabhängiger Experimente. **D)** Zytospins der CFU-G/CFU-G* und CFU-GM/CFU-GM* zeigen eine linksverschobene Myelopoese in den $Runx1^{-//-}$ Kulturen. Pappenheimfärbung; Die Bilder wurden in 630-facher Vergrößerung aufgenommen. 63x Objektiv; 10x Okular **E)** Durchflusszytometrische Analyse suspendierter Zellen aus Methylzellulose. $Runx1^{-//-}$ Kulturen zeigten eine verminderte Expression des Oberflächenmarkers Gr1. **F)** 2%iges Agarosegel der PCR-Amplifikate zum Nachweis der *Excision* von *Runx1*. Die angegebenen Zellfraktionen wurden isoliert, gDNA isoliert und per PCR amplifizert. Das Amplifikat des wt-Allels resultiert in einer 260 bp Bande, das durch CRE-Aktivität veränderte Allel hingegen in einer 382 bp Bande.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beeinträchtigung der myeloischen Differenzierung durch die Inaktivierung von Runx1 lieferten durchflusszytometrische Analysen der gesamten Zellpopulation des Knochenmarks Runx1-exprimierender und -defizienter Mäuse. Um dendritische-, sowie B-Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde hierbei die B220-negative Knochenmarkpopulation auf die Expression der myeloischen Oberflächenantigene CD11b und Gr1 hin untersucht. Die in Abb. 8A dargestellte, durchflusszytometrische Analyse verdeutlicht den großen Anteil unreifer myeloischer Zellen mit einer schwachen Gr1-Expression in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Mäusen gegenüber $Runx1^{+/+}$ Mäusen.

Bezogen auf die CD11b-exprimierenden Zellen lag der durchschnittliche Anteil unreifer Zellen (schwache Gr1-Expression) gegenüber den reifen Zellen (starke Gr1-Expression) in den $Runx1^{+/+}$ Mäusen bei 17% vs. 83% und bei 49% vs. 51% in der $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Kohorte. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied, der in Abb. 8B anhand des Koeffizienten unreifer/reifer Zellen dargestellt ist.

Im Einklang mit den *in vitro* erzielten Ergebnissen konnte somit auch *in vivo* bestätigt werden, dass der Verlust von Runx1 die terminale Differenzierung myeloischer Zellen beeinträchtigt.



Abb. 8: Der Knockout von Runx1 führt zu einer Vermehrung unreifer myeloischer Zellen im Knochenmark. A) Repräsentative, durchflusszytometrische Analysen der Knochenmarkzellen einer $Runx1^{+/+}$ und einer $Runx1^{-/-}$ -Maus. In der $Runx1^{-/-}$ -Maus ist der Anteil unreifer myeloischer Zellen (schwache Gr1-Expression) gegenüber der Kontrollmaus deutlich vergrößert. B) Quantifizierung der Ratio unreifer/reifer myeloischer Zellen (CD11b+ Gr1^{schwach}/CD11b+ Gr1^{hoch}). Die Ratio jeder analysierten Maus ist als ein Punkt dargestellt, der Mittelwert mit Standardfehler für die angegebene Stichprobengröße (n) mit Standardfehler ist als Balken dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde anhand eines einfachen T-Tests berechnet.

5.1.2.2 Runx1 hat keinen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen monozytärer und granulozytärer Differenzierung

Durch die zuvor beschriebenen Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass Runx1 eine wichtige Funktion während der Differenzierung myeloischer Zellen hat. Weiterhin deuteten die *in-vitro*-Differenzierungsanalysen auf eine stärkere Beeinträchtigung der myeloischen-, im Vergleich zu der granulozytären Linien hin.

Um den Effekt der Runx1-Inaktivierung auf diese beiden myeloischen Kompartimente genauer zu analysieren, wurden Knochenmark- und Blutzellen aus *Runx1*^{+/+} und *Runx1*^{Δ/Δ} Mäusen immunhistochemisch auf den Anteil monozytärer und granulozytärer Zellen hin untersucht. Während das Oberflächenantigen CD11b sowohl von Granulozyten als auch von Monozyten, nicht aber von anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, können diese beiden myeloischen Populationen im Knochenmark anhand der Glykoproteine Ly6g (granulozytär exprimiert) und Ly6c (monozytär exprimiert) unterschieden werden. Im Blut erfolgt die Unterscheidung durch das ausschließlich monozytär exprimierte Oberflächenantigen F4/80 (Abb. 9A).

Die Analyse des Knochenmarks Runx1-exprimierender und Runx1-defizienter Mäuse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Monozyten/Granulozyten-Ratio (M/G) (Abb. 9C). Durchschnittlich lag der Anteil monozytärer (Ly6c⁺) gegenüber granulozytärer (Ly6g⁺) Zellen in der *Runx1^{+/+}* Kohorte bei 16% vs. 74%, in der *Runx1^{Δ/Δ}* Kohorte bei 13% vs. 77%. So ergab sich eine M/G-Ratio von 0,20 bzw. 0,16. Allerdings wiesen die Runx1-defizienten Granulozyten ein deutlich reduziertes Expressionsniveau der Oberflächenantigene Ly6g und Ly6c auf, was erneut auf eine fehlende Ausreifung dieser Zellen hinweisen könnte. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Expression der, für diese Oberflächenproteine codierenden Gene von Runx1 reguliert wird.

Anhand von Zytospins knochenmarkstämmiger Granulozyten und Monozyten konnte der undifferenzierte Phänotyp der $Runx1^{\Delta\Delta}$ Zellen im Vergleich zu $Runx1^{+/+}$ Zellen jedoch zusätzlich bestätigt werden (Abb. 9B). Im Vergleich zu den Kontrollmäusen wiesen die Knochenmarkzellen Runx1-deletierter Mäuse deutlich mehr Monoblast auf, aber auch die Anzahl der Myeloblasten war vermehrt.

Auch im peripheren Blut der Mäuse sollte das Verhältnis von Monozyten zu Granulozyten analysiert werden. Hierfür wurde aus submandibular entnommenen Blut die Erythrozyten depletiert und die verbleibenden Zellen auf die myeloische, CD11c-negative, MHCII-negative, CD11b-positive Fraktion hin analysiert. Diese Population lässt sich anhand der F4/80-Expression in Granulozyten (F4/80⁻) und Monozyten (F4/80⁺) unterteilen. Da der Verlust

von Runx1 eine Blockade in der B-und T-Zellreifung zur Folge hat, war der prozentuale Anteil myeloischer Zellen (CD11b⁺) in den *Runx1*^{Δ/Δ} Mäusen größer als in den Runx1-exprimierenden Wurfgeschwistern (Abb. 9D links). Dennoch war, bezogen auf den Anteil CD11b-positiver Zellen, kein Unterschied in der Monozyten/Granulozyten-Ratio zu beobachten. Der durchschnittliche Anteil monozytärer gegenüber granulozytärer Zellen betrug in der *Runx1*^{+/+} Kohorte 25% vs. 75%, in der *Runx1*^{Δ/Δ} Kohorte 27% vs.73%, sodass sich eine M/G-Ratio von 0,34 bzw. 0,36 und somit kein signifikanter Unterschied ergab. Dennoch war deutlich ersichtlich, dass im Vergleich zu den Runx1-exprimierenden Monozyten/Makrophagen, ein Teil der Runx1-deletierten Zellen eine verstärkte F4/80-Expression aufwies.

Zusammenfassend belegen diese Untersuchungen, dass Runx1 keinen Einfluss auf die Differenzierungsentscheidung zwischen der monozytären oder der granulozytären Linie hat. Weder im Knochenmark noch im Blut der analysierten Mäuse führte der Verlust von Runx1 zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Monozyten/Makrophagen und Granulozyten. Bedingt durch das Fehlen reifer lymphatischer Zellen in den *Runx1* knockout-Mäusen war der relative Anteil myeloischer Zellen gegenüber den Runx1-exprimierenden Mäusen jedoch erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Runx1 in den Granulozyten zu einer verminderten Expression der Oberflächenmarker Ly6g und Ly6c führt. Dagegen war die Expression des Monozyten/Makrophagenmarkers F4/80 erhöht. Gründe hierfür könnte zum einen eine beeinträchtigte Differenzierung oder zum anderen die Regulation dieser Gene durch Runx1 sein.



Abb. 9: Runx1 hat keinen Einfluss auf die G vs. M Differenzierungsentscheidung A) Schematische Darstellung der Oberflächenantigenexpression knochenmarkständige und peripherer Granulozyten und Monozyten. B) Zytospins monozytärer (CD11b⁺, Ly6c^{hi}, Ly6c⁻) und granulozytärer (CD11b⁺, Ly6c^{low}, Ly6g⁺) Knochenmarkzellen von $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{-\Delta/\Delta}$ Mäusen indizieren eine linksverschobene, myeloischen Differenzierung in $Runx1^{-\Delta/\Delta}$ Mäusen, gekennzeichnet durch das vermehrten Auftreten von Myelozyten und Promonozyten. Pappenheimfärbung; Die Bilder wurden in 630-facher Vergrößerung aufgenommen. 63x Objektiv; 10x Okular. C)+D) Links: Repräsentative, durchflusszytometrische Analysen der Knochenmark- (C) und Blutzellen (D) einer $Runx1^{+/+}$ und einer $Runx1^{-\Delta/\Delta}$ -Maus. $Runx1^{-\Delta/\Delta}$ -Mäuse zeigen ein vermindertes Expressionsniveau der Oberflächenantigene Ly6c und Ly6g. Rechts: Quantifizierung der M/G-Ratio. Die Ratio jeder analysierten Maus ist als ein Punkt dargestellt und der Mittelwert mit Standardfehler für die angegebene Stichprobengroße (n) ist als Balken dargestellt. Ein einfacher t-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Kohorten. hi: *high* (starke Expression); lo: *low* (schwache Expression)

Aus den bisherigen Experimenten geht hervor, dass der Verlust von Runx1 zu einer Expansion des myeloischen Progenitorkompartiments im Knochenmark führt; wobei sowohl die Progenitoren der megakaryozytischen-erythroiden Linie, als auch jene der granulozytärmonozytären Linie signifikant vermehrt sind. Weiterhin führte die Inaktivierung von Runx1 in *in vitro*-Differenzierungsversuchen zu einem erhöhten Kolonienbildungspotential, sowie zu einer fehlerhafte Ausreifung der Zellen. Eine verminderte Differenzierung myeloischer Zellen bei dem Knockout von Runx1 konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Letztlich konnte gezeigt werden, dass Runx1 keinen Einfluss auf die granulozytäre vs. monozytäre Differenzierungsentscheidung nimmt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass in Abwesenheit von Runx1 die myeloische Differenzierung zwar eingeschränkt, nicht aber blockiert ist. Dieses könnte die Expansion der myeloischen Progenitoren erklären.

5.2 Identifikation von Runx1-Zielgenen in frühen myeloischen Zellen

Die bisher gezeigten Experimente deuten darauf hin, dass Runx1 in der Regulation der Differenzierung myeloischer Progenitorzellen eine wichtige Funktion hat. Da bis heute nur wenige Runx1 Zielgene beschrieben wurden, war es das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit Zielgene zu identifizieren, deren Deregulation die fehlerhafte Myelopoese bedingt.

Hierzu wurden Genexpressionsanalysen myeloischer Progenitorzellen durchgeführt die entweder defizient für Runx1 waren oder manipuliert wurden, sodass sie ein induzierbares RUNX1-Protein überexprimierten. Direkte Runx1-Zielgene sollten zusätzlich durch die genomweite Analyse von Runx1-DNA-Bindungstellen identifiziert werden.

5.2.1 Der Verlust von Runx1 induziert eine gesteigerte Expression HSZ-spezifischer Gene

Zur Identifikation potentieller Zielgene von Runx1 wurden in einem ersten Schritt gesamtgenomische Genexpressionsanalysen Runx1-defizienter und -exprimierender früher myeloischer Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die GMP-Populationen aus $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Mäusen durchflusszytometrisch isoliert und bei -80°C schockgefroren (Abb. 10A). In vier Ansätzen wurden jeweils die Zellen von 5-10 Mäusen vereinigt. Die Extraktion der RNA sowie alle weiteren Arbeitsschritte wurden von *Miltenyi Biotec* durchgeführt. Die übermittelten normalisierten Daten der Expressionsstärke einzelner Gene in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ und $Runx1^{+/+}$ Zellen wurden anschließend miteinander verrechnet, wodurch signifikant deregulierte Gene identifiziert wurden. Als Schwellenwerte für diese Auswertung wurde zum einen eine Expressionsstärke von mindestens 1 und zum anderen eine dreifache Regulation der Expression zwischen beiden
Proben festgelegt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 10 in Form eines Streudiagramms dargestellt. Der Logarithmus des Quotienten, der sich aus der Verrechnung der mittleren Expressionsstärke jedes untersuchten Genes der beiden GMP-Populationen ergibt, ist in einem logarithmischen Koordinatensystem jeweils als Kreuz dargestellt. Hierbei symbolisieren rote Kreuze in $Runx1^{\Delta/\Delta}/Runx1^{+/+}$ GMPs hochregulierte Gene, während grüne Kreuze für Gene stehen, deren Expression reduziert war. Mit grauen Kreuzen sind jene Gene gekennzeichnet, die unter dem oben beschriebenen Schwellenwert lagen. In der Summe ergab diese Auswertung eine signifikant erhöhte Expression von 351 Genen und eine verminderte Expression von 216 Genen in der $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMP-Population im Vergleich zur $Runx1^{+/+}$ GMP-Population.

Zur Validierung der Mikroarraydaten wurden q*RT*-PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden fünf, im Mikroarray stark regulierte Gene ausgewählt und deren Transkriptmenge in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMP und $Runx1^{+/+}$ GMP analysiert (Abb. 10B). Sowohl für die vier Gene die laut Mikroarray in der $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMP-Population eine verstärkte Expression aufwiesen (*Mpl, Dlk1 Jam3* und *Treml1*), als auch für das herunterregulierte Gen *Ly6c1* konnte ein analoges Expressionsmuster via q*RT*-PCR nachgewiesen werden (Abb. 10 C).

Funktionale Analysen der GMP-Populationen hatten zuvor bereits gezeigt, dass der Knockout von Runx1 einen negativen Einfluss auf die Differenzierung dieser Zellen hat. Infolgedessen wurden die potentiellen Zielgene näher auf ihre Implikation in der Differenzierung untersucht. Die 567 zwischen der Runx1^{Δ/Δ} und der Runx1^{+/+} GMP-Population signifikant regulierten Gene wurden mit jenen 150 Genen verglichen, deren Expression während der Differenzierung von der HSZ zum GMP am stärksten variiert (Heng and Painter, 2008). Dieser Vergleich ergab, dass 13% der im Verlauf der Differenzierung regulierten Gene in der Runx1^{$\Delta\Delta$} GMP-Population einer reziproken Regulation unterlagen. Insbesondere Gene membranständiger Faktoren und Zelladhäsionsfaktoren, deren Expressionsniveau im Laufe der normalen Differenzierung abnimmt, wurden in den Runx1-defizienten Progenitoren weiterhin stark exprimiert. Hierzu gehörten die Gene Emcn, Tek und Plxnc1. Unter den reziprok exprimierten Genen befand sich auch das bereits beschriebene Runx1-Zielgen Mpl, das für den Thrombopoetinrezeptor kodiert (Satoh, et al., 2008). Demgegenüber ergab der Vergleich der putativen Runx1-Zielgene zu jenen Genen, die während der Ausreifung der GMPs zu Monozyten am stärksten reguliert sind, nur ein einzelnes reziprok exprimiertes Gen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutsamkeit von Runx1 für die Repression stammzellspezifischer Gene.

Zusammengefasst führten die Geneexpressionsanalysen Runx1-defizienter und -exprimierender Granulozyten-Monozyten-Progenitoren zur Identifikation 567 potentieller Runx1 Zielgene. Zudem ging aus dieser Analyse hervor, dass der Verlust von Runx1 in GMP-Zellen zu einer erhöhten Expression stammzellspezifischer Gene führt. Dies deutet auf eine geringere Differenzierung der Runx1-deletierten GMPs im Vergleich zu Runx1-exprimierenden GMPs hin.





Abb. 10: Der Verlust von Runx1 in GMPs führt einer verstärkten Expression HSZzu spezifischer Gene. A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Aus $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Mäusen wurden GMPs isoliert und einer gesamtgenomischen Genexpressionsanalyse unterzogen. Die Analyse wurde für vier unabhängige Proben durchgeführt. B) Streudiagramm der Genexpressionsstärken aller annotierten Gene in $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMP. Die Inaktivierung von Runx1 bewirkt eine verstärkte Expression von 351 Genen (rote Kreuze) und eine verminderter Expression von 216 Genen (grüne Kreuze). Blaue Kreuze symbolisieren Gene mit unveränderter Expression, graue Kreuze kennzeichnen Gene deren Expression unter dem Schwellenwert lag. C) Validierung der Mikroarrayanalysen mittels gRT-PCR. mRNA aus $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMPs wurde mittels spezifischer Primer auf die Expression der im Mikroarray stark regulierten Gene Mpl, Dlk1, Jam3 und Ly6c1 hin analysiert. D) Heatmap der Expression von 19 Genen die im Laufe der Differenzierung von der HSZ zum GMP stark reguliert werden und durch den Inaktivierung von Runx1 reziprok exprimiert wurden (Heng and Painter, 2008). Dargestellt sind die Logarithmen des Quotienten Intensität in HSZ/ Intensität in GMP bzw. Intensität in Runx1^{Δ/Δ} Intensität in Runx1^{+/+} GMP/ GMP. Gelbe Felder indizieren eine verstärkte Expression, blaue Felder symbolisieren eine verringerte Expression.

5.2.2 Identifikation von RUNX1-Zielgenen bei RUNX1-Überexpression

Basierend auf den Genexpressionsanalyen Runx1-exprimierender und Runx1-defizienter myeloischer Progenitoren konnten Gene ermittelt werden, deren Expression entweder direkt oder über einen indirekten Mechanismus von Runx1 reguliert werden. Im zweiten Schritt wurde weiterführend analysiert, welche der beschriebenen Gene direkte Zielgene von Runx1 sind. Hierzu wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz ein induzierbares RUNX1-Protein *in vivo* überexprimiert, die Genexpression der myeloischen Progenitorzellen analysiert und mit den Expressionsdaten der *Runx1*-Knockout Analysen verglichen.

5.2.2.1 Etablierung eines induzierbaren RUNX1 Überexpressionssystems

Da vorrangegangene Studien der Arbeitsgruppe "Molekulare Pathologie" gezeigt haben, dass die ektope Expression von RUNX1 das Zellwachstum primärer Stamm- und Progenitorzellen negativ beeinflusst, wurde ein induzierbares RUNX1-Überexpressionsmodell etabliert. In diesem Modell ist es auf Grund der Fusion von RUNX1 mit einer Mutante des Östrogenrezeptos (ERt2) möglich, die Lokalisation und somit die transkriptionelle Aktivität des Fusionsproteins zu regulieren. Durch die Interaktion des Östrogenrezeptors mit Chaperonen ist das Fusionsprotein zytoplasmatisch lokalisiert. Erfolgt die Rezeptorstimulation durch die Zugabe des Liganden Tamoxifen, bewirkt dieses die Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus, sodass die transkriptionelle Regulation stattfinden kann.

Zunächst wurde die Induzierbarkeit des Fusionsproteins überprüft. Hierzu wurden SC-1 Fibroblasten mit gammaretroviralen Vektoren transduziert, die sowohl für die *RUNX1-ERt2*cDNA als für auch des Reportergen *gfp* codieren. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe von Tamoxifen zum Kulturmedium. Anschließend wurde die Lokalisation des Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Als Kontrolle dienten Ethanol behandelte Zellen (Abb. 11A). Während in diesen Kontrollkulturen das RUNX1-ERt2-Fusionprotein wie erwartet nahezu ausschließlich im Zyotoplasma nachgewiesen werden konnte, bewirkte die Tamoxifenstimulation die Translokation des Proteins in den Nukleus (Abb. 11B). Da es sich bei dem verwendeten retroviralen Vektor um ein bicistronischen Konstrukt handelte, war die Lokalisation des GFPs von der Stimulation unabhängig.



Abb. 11: Etablierung eines induzierbaren RUNX1-Überexpressionssystems. A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. SC-1-Zellen wurden mit RUNX1-ERt2iGFP exprimierenden Gammaretroviren transduziert und mit 1 μ M 4-OHT oder Ethanol (EtOH) behandelt. B) Immunfluoreszenzfärbung unbehandelter (oben) oder behandelter (unten) SC-1-Zellen. GFP wird ubiquitinär exprimiert. Das RUNX1-ERt2 Fusionsprotein wird erst nach Zugabe von Tamoxifen in den Nukleus transloziert. Links: ektopisch exprimiertes GFP; Mitte: Anti-Runx1-Alexa555-Färbung; Rechts: *Merge* der GFP- und Alexa-555-Signale.

Nachdem die Induzierbarkeit des Systems belegt werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch untersucht, ob durch die ektopische Expression des RUNX1-Fusionsproteins der zuvor beschrieben Differenzierungsdefekt Runx1-defizienter Zellen aufgehoben werde kann. Zu diesem Zwecke wurden frühe Progenitorzellen aus *Runx1*^{MA} Mäusen isoliert und mit RUNX1-ERt2/eGFP- bzw. ERt2/eGFP-codierenden Gammaretroviren transduziert. Im Anschluss daran wurde die transduzierte (GFP-exprimierende) GMP-Fraktion durchflusszytometrisch sortiert und je 5 x 10³ Zellen in Methylzellulosemedium ausplattiert. Das Medium wurde entweder mit 1 μ M 4-OHT oder mit der adäquaten Menge Ethanol supplementiert. Die Auszählung der Kolonien nach 7 Tagen Kultivierung ergab keinen signifikanten Unterschied der Gesamtkolonienzahl, zwischen den ektopisch RUNX1-exprimiereden Kolonien und den Kontrollkulturen (Abb. 12B). Auch die tamoxifeninduzierte Aktivierung des RUNX1-Fusionsproteins hatte keinen Einfluss auf das Kolonienbildungspotential der Zellen.

In bereits zuvor beschriebenen *colony-forming-assays* konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von Runx1 nach der Kultivierung in Methylzellulosemedium zu einer verminderten Differenzierung der Zellen führte, gekennzeichnet durch eine reduzierte Gr1-Expression (vgl. Abb. 7). Durchflusszytometrische Analysen sollten Aufschluss darüber geben, ob dieser Differenzierungsdefekt durch die Expression des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins aufgehoben werden kann. Wie erwartet konnte für die ERt2 exprimierenden *Runx1*^{Δ/Δ} Kulturen, sowie für die

unstimulierten RUNX1-ERt2-exprimierenden Kulturen nur ein geringer Anteil reifer (CD11b⁺, Gr1^{hi}) myeloischer Zellen von 35% bzw. 23% nachgewiesen werden. Hingegen führte die ektopische RUNX1-ERt2-Expression in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Zellen bei gleichzeitiger Tamoxifenstimulation dazu, dass 65% der infizierten Zellen weiter differenziert und stark positiv für das Oberflächenantigen Gr1 waren. Als zusätzliche Kontrolle für die durchflusszytometrischen Analysen dienten mit eGFP transduzierte $Runx1^{+/+}$ GMPs. Nach 7 Tagen Kultivierung in Methylzellulose wiesen diese 73% reife myeloische Zellen auf (CD11b⁺, Gr1^{hi}).

Im Ganzen konnte durch diese Experimente die Funktionalität des induzierbaren RUNX1-Expressionssystems erwiesen werden. Zum einen belegten die immunhistologischen Untersuchungen, dass nach der Tamoxifenstimulation die Translokation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins vom Zytoplasma in den Nukleus erfolgt. *In vitro* Differenzierungsanalysen zeigten zum anderen, dass der, durch den Knockout von Runx1 induzierte, Differenzierungs-defekt durch die Expression und Aktivierung des RUNX-ERt2 Fusionsproteins aufgehoben werden kann.



Abb. 12: Das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein rettet den Differenzierungsdefekt Runx1-defizienter GMPs A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Frühe $Runx1^{\Delta\Delta}$ Progenitorzellen wurden mit gammaretoviralen Vektoren transduziert die entweder für RUNX1-ERt2iGFP oder ERt2iGFP kodierten. Die transduzierte GMP-Population wurde isoliert und in Methylzellulose kultiviert, der entweder Ethanol oder 4-OHT zugesetzt war. B) Quantifizierung der Gesamtkolonienzahl nach 7 Tage Kultivierung in Methylzellulose. Dargestellt sind die Gesamtkolonienzahlen zweier unabhängiger, in Triplikaten durchgeführter Experimente (•, •). Weder die Expression des Fusionsproteins noch die Tamoxifenstimulation hatte einen Einfluss auf die Gesamtkolonienzahl. C) Durchflusszytometrische Analyse GFP-positiver Zellen aus Methylzellulose. $Runx1^{\Delta\Delta}$ GMPs differenzieren durch die Überexpression von RUNX1-ERT2 bei 4-OHT Behandlung weiter aus (CD11b⁺Gr1^{hi}) als ohne Stimulation oder bei Expression des GFP-Kontrollvektoren.

5.2.2.2 RUNX1-Zielgene im Überexpressionssystem

Durch die Analyse der Genexpressionsprofile Runx1-exprimierender und Runx1defizienter GMPs konnten 567 Gene ermittelt werden, deren Expression in Abhängigkeit von Runx1 reguliert wird. Ob es sich hierbei um eine direkte Regulation handelt oder um einen indirekten Mechanismus kann aus der Analyse jedoch nicht gefolgert werden. Direkte Runx1-Zielgene sollten daher anhand einer reziproken Regulation in einem Überexpressionssystems bestätigt werden. Um mit einem System zu arbeiten, dass möglichst gut mit den bereits analysieren primären $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMPs vergleichbar ist, wurde ein induzierbares *in* vivo Runx1-Überexpressionsmodell etabliert und darin die Genexpression in der GMP-Population analysiert.

Hierzu wurden *Runx1*[™]Mäuse mit 5-FU behandelt um die Progenitorzellpopulation *in vivo* zu expandieren. Drei Tagen später wurde das Knochenmark entnommen und mit gammaretrorviralen Vektoren transduziert. Diese exprimierten entweder RUNX1-ERt2/eGFP oder das Kontrollkonstrukt ERt2/eGFP. Anschließend wurden die Zellen in letal bestrahlte B6-Mäuse transplantiert. Nach 7 Wochen erfolgte die Aktivierung des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins durch die Fütterung der Mäuse mit tamoxifenhaltigen Pellets. Zusätzlich wurde 3 Tage vor der Isolation des Knochenmarks, täglich interperitoneal Tamoxifen injiziert. Nach Depletion der reifen Knochenmarkzellen erfolgte die durchflusszytometrische Isolation der GFP-positive GMP-Fraktion. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt und für jeden Ansatz wurden, abhängig von der Infektionsrate der Knochenmarkzellen, die Zellen von 3-6 Mäusen vereinigt. Die Extraktion der RNA, sowie alle weiteren Arbeitsschritte wurden von *Miltenyi Biotec* durchgeführt.

Die übermittelten, normalisierten Daten der Expressionsstärke einzelner Gene der B6-*Runx1*^{$\Delta\Delta$}-RUNX1-ERt2-Zellen wurden mit den Expressionsdaten der B6-*Runx1*^{$\Delta\Delta$}-Strep-ERt2 Zellen verrechnet, sodass signifikant deregulierte Gene identifiziert wurden. Die Analyse erfolgte analog zu den Runx1-deletierten Zellen. Hieraus ergaben sich 722 Gene, die nach der Überexpression von RUNX1 verstärkt exprimiert wurden und 387 Genen deren Expression vermindert war. Letztlich wurden die anhand des Überexpressionssystems identifizierten Runx1-Zielgene mit den potentiellen Zielgene aus dem Knockout-System verglichen. Als Kriterien für diese Analysen wurde eine Expressionstäke von mindesten 1 in alle sechs durchgeführten Genexpressionsanalysen sowie eine mindestens dreifache bzw. zweifache Regulation im Knockout- bzw. im Überexpressionssystem, festgelegt. Unter Einsatz dieser stringenten Kriterien konnten 50 reziprok regulierte Gene ermittelt werden, deren Expressionen in der Heatmap in Abb. 13C dargestellt ist. Funktionale Genannotationanalysen ergaben eine starke Deregulation von Adhäsions- und Signalmolekülen. Außerdem führte die Inaktivierung von Runx1 zu einer erhöhten Expression einiger proapoptotischer Gene (Huang da, *et al.*, 2009a; Huang da, *et al.*, 2009b).

Zusammenfassend konnten durch das RUNX1-Überexpressionssytems 1109 potentielle RUNX1-Zielgene detektiert werden. 50 dieser Gene zeigten in Runx1-defezienten myeloischen Progenitoren eine reziproke Regulation und sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit direkte Zielgene von Runx1.



Abb. 13: *In vivo* RUNX1-Überexpressionsmodell zur Identifikation direkter RUNX1-Zielgene. A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Mäuse wurden mit 5-FU behandelt, das Knochenmark isoliert und mittels retroviraler Vektoren entweder mit RUNX1-ERt2/eGFP oder ERt2/eGFP transduziert. Die transduzierten Zellen wurden intravenös in letal bestrahlte B6-Mäuse transplantiert. Ab Woche 4 nach der Transplantation erhielten die Mäuse tamoxifenhaltiges Futter, zusätzlich wurden den Mäusen an drei aufeinanderfolgenden Tagen 49,5 µg/g Körpergewicht 4-OHT i.p verabreicht. Am Folgetag wurde das Knochenmark isoliert, infizierte (GFP⁺) GMPs isoliert, und für die Mikroarrayanalyse vorbereitet. B) Streudiagramm der Genexpressionsstärken aller annotierten Gene in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ RUNX1-ERt2 und B6- $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -Strep-ERt2 GMPs. Die Überexpression von RUNX1 induzierte eine verstärkte Expression von 722 Genen (rote Kreuze) und eine verminderte Expression von 387 Genen (grüne Kreuze). Blaue Kreuze symbolisieren Gene mit unveränderter Expression, graue Kreuze kennzeichnen Gene deren Expression unter dem Schwellenwert lag. C) Heatmap der Expression der 50 Gene, die in der $Runx1^{\Delta/\Delta}$ - und der B6- $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -RUNX1-ERt2 GMP-Population reziprok reguliert waren. Dargestellt sind jeweils die Logarithmen der Quotienten Intensität in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -GMP/ Intensität in $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -GMP (Spalte1-4) bzw. Intensität in B6- $Runx1^{\Delta/\Delta}$ -RUNX1-ERt2 GMP/ Intensität in B6-ERt2 GMP (Spalte 5+6). Rote Felder indizieren eine verstärkte Expression, grüne Felder indizieren eine verringerte Expression. Die rechte Spalte gibt die Lokalisation der dem jeweiligen Gen nächstgelegenen RUNX1-Bindungsstellen in FDC-P1-Zellen an 1) intrag-en (zwischen oder auf den Gengrenzen); 2) proximal (innerhalb 10 kp *upstream* oder *downstream*); 3) distal (zwischen 10 kb und 100 kb *upstream* oder *downstream*); 4) > 100 kb von den Gengrenzen entfernt.

5.2.3 Identifizierung direkter RUNX1-Zielgene

Neben den bereits beschriebenen Genexpressionsanalysen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um direkte Zielgene von Runx1 in der frühen Myleopoese zu bestätigen. Mittels ChIP-Sequenzierungen (ChIP-Seq) sollten genomweit Runx1-Bindestellen an Promotor- und *Enhancer*-Regionen analysiert werden. Da für eine solche Analyse große Menge DNA erforderlich ist, wurden diese Analysen in einer immortalisierten murinen Zellline (FDC-P1) durchgeführt.

5.2.3.1 Charakterisierung der FDC-P1-Zelllinie

In einem ersten Schritt wurde die FDC-P1 Progenitorzelllinie durchflusszytometrisch auf die Expression einiger Differenzierungsmarker untersucht (Abb. 14A). Diese Analyse demonstrierte, dass die immortalisierte Zelllinie ebenso wie die GMP-Population den Stammund Progenitorzellmaker Kit und den auf frühen myeloischen Zellen vorhandenen Fcγ-Rezeptor (CD16/32) exprimierte (Abb. 14B links+Mitte). Zusätzlich sind FDC-P1-Zellen positiv für den CD150-Rezeptor (Abb. 14B links+Mitte). Hingegen zeigte die Zelllinie keine Expression der auf reifen myeloischen bzw. reifen Megakaryozyten vorhandenen Oberflächenantigene CD11b und CD41, sodass bestätigt werden konnte, dass es sich bei FDC-P1 Zellen um eine frühe myeloische Zelllinie handelt.

Zusammengefasst wies die FDC-P1-Zelllinie einen ähnlichen Immunphänotypen wie die zuvor analysierte, primäre GMP-Population auf und war somit als Modellsystem für die DNA-Bindungsanalysen geeignet.



Abb. 14: Charakterisierung der murinen Progenitorzelllinie FDC-P1 A) Schematische Darstellung der Oberflächenantigenexpression muriner Knochenmarkzellen während der frühen myeloischen Differenzierung. Gestrichelte Linien symbolisieren die Expression des jeweiligen Rezeptors, Pfeile indizieren die Expressoinsmaxima. B) Durchflusszytometrische Analyse der FDC-P1-Zellen: die frühen (myeloischen) Marker Kit, CD16/32 und CD150 wurden (stark) exprimiert, während die spät-myeloischen Marker CD11b und CD41 nicht nachgewiesen werden konnte.

5.2.3.2 Analyse genomweiter RUNX1-DNA-Bindestellen in myeloischen Progenitoren

Um weiterhin zu ermitteln, welche der im Mikroarray identifizierten Gene direkte Runx1-Zielgene sind, wurden unter Einsatz der Chip-Sequenzierung-Technologie genomweit die RUNX1-Bindungsstellen an die DNA analysiert. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die DNA-Bindungsstellen des endogen in FDCP1-Zellen exprimierten Runx1-Proteins, sowie eines überexprimierten RUNX1-ERT2-Fusionsproteins untersucht. Zur Etablierung des induzierbaren RUNX1-Überexpressionssystems wurden FDC-P1-Zellen zunächst mit RUNX1-ERt2-codierenden Retroviren transduziert, durchflusszytometrisch sortiert und die Überexpression des Fusionsproteins mittels einer Western Blot Analyse überprüft (Abb. 15). Für die Immunpräzipitation wurden RUNX1-ERt2-überexprimierende Zellen zunächst 24 Stunden mit Tamoxifen behandelt, anschließend erfolgte die Vernetzung der DNA mit den assoziierten Proteinen. Bei der Analyse der Bindungsstellen des endogenen Runx1-Proteins entfiel die 24stündige Stimulation. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die DNA sonifiziert, sodass kurze DNA-Abschnitte entstanden. Die Präzipitation der DNA-Protein-Komplexe erfolgte durch die Zugabe eines Runx1-spezifischen Antikörpers und Protein A gekoppelter Agarose-Beats (Abb. 16). Nach der Degradation der Proteine wurden die eluierten DNA-Fragmente im Hochdurchsatzverfahren sequenziert (NGS; next generation sequencing) und gegen das murine abgeglichen. Als Kontrollen dienten jeweils Immunpräzipitationen (IP) Genom der beschriebenen Zellen mit einem unspezifischen IgG-Protein (IgG-Kontrolle).



Abb. 15: Western Blot zur Analyse der Überexpression des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in FDC-P1-Zellen. Die durch SDS-PAGE (8,5%ig) aufgetrennten Proteinlystes uninfizierter FDC-P1-Zellen und RUNX1-ERt2, RUNX1^{R136G}-ERt2 oder ERt2 überexprimierender FDC-P1-Zellen zeigen eine deutliche Überexpression des RUNX-ERt2-Fusionsproteins (107 kDa) im Vergleich zur Expression des endogenen Runx1 (48 kDa). Als Ladekontrolle der Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen das glykolytische Enzym Gapdh (37 kDa) eingesetzt.

Die Analyse der Sequenzdaten der endogenen Runx1-Chromatin-IP ergab 25.819 *peaks.* Ein peak entspricht hierbei einem Abschnitt des Genoms der mehrfach sequenziert wurde und somit höchst wahrscheinlich eine Runx1-DNA-Bindungstelle darstellt. Hingegen konnten anhand der Überexpression von RUNX1-ERt2 lediglich 6.326 *peaks* identifiziert werden. Da beide Experimente bioinformatisch unter Verwendung derselben Parameter ausgewertet wurden, lassen sich die deutlichen Unterschiede der Anzahl putativer Bindestellen nur durch mögliche Interferenzen der fusionierten Östrogenrezeptor mit der DNA-Bindung oder durch unbekannte technische Schwierigkeiten erklären. Der Vergleich beider Datensätze zeigte jedoch, dass 5339 Runx1-gebundene DNA-Abschnitte (84% der *peaks* der RUNX1-ERt2-IP), lokalisiert in 3515 Genloci, in beiden Ansätzen auftraten (Abb. 16B) und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit direkte Runx1-Zielgene darstellen.

Um weiterhin zu untersuchen wie die Genexpression mit der Runx1-DNA-Bindung korreliert, wurde der nächstgelegene Runx1-*peak* für alle zuvor identifizierten potentiellen Runx1-Zielgene bestimmt und seine relative Lokalisation zum Gen bestimmt (Abb. 16C). Für 30% der potentiellen Runx1-Zielgene die in der ChIP-Analyse annotiert waren (n=1075) konnte eine Runx1-Bindung innerhalb eines Bereichs von 10 kb vor oder hinter dem Gen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnten für Kontrollgene, die ein ähnliches Expressionsniveau aufwiesen, deren Expression durch Runx1 aber nicht reguliert wurde, in weniger als 19% der Fälle eine Runx1-Bindung nachgewiesen werden. Für die 50 zuvor charakterisierten, im Runx1-Deletions- und Überexpressionsansatz reziprok regulierten Gene, ist in Abb. 13B neben den

Expressionsintensitäten ebenfalls die Lokalisation der nächstgelegenen Runx1-Bindestelle in FDCP1-Zellen angegeben (Spalte 7).

Weiterhin wurde untersucht, welche anderen Transkriptionsfaktoren in myeloischen Progenitoren mit Runx1 zusammenwirken und die Genexpression regulieren. Hierzu wurden 500 Runx1-*peaks* zufällig ausgewählt und die flankierenden Sequenzen dahingehend untersucht, ob sie Motive für Transkriptionsfaktoren enthielten (*de novo*-Motiv-Analyse). In 100% der analysierten *peaks* konnte ein Motiv identifiziert werden, dass dem RUNX1 Bindungsmotiv entspricht, sodass die Zuverlässigkeit der Analyse bestätigt werden konnte. Mit Frequenzen von 45,8%, 11%, 9% und 5,6% konnten weitere Motive identifiziert werden, die die Konsensussequenz für Ets1/Spi1, Stat, Cebpa und Gata entsprachen. Dieses deutet auf ein Zusammen-wirken dieser Faktoren mit Runx1 hin.

Zusammenfassend können durch die Ergebnisse der ChIP-Studien an der myeloischen Progenitorzellinie FDC-P1 drei wichtige Aussagen getroffen werden: 1) In myeloischen Progenitorzellen bindet Runx1 an mehr als 5000 DNA-Abschnitte, verteilt auf rund 3500 Genloci. 2) Für 30% der durch Expressionsanalyse als Runx1-Zielgene identifizierten Gene konnte eine Interaktion zwischen RUNX1 und der Promotor-/*Enhancer*-Region des jeweiligen Gens nachgewiesen werden. 3) Bei der transkriptionellen Regulation seiner Zielgene kooperierte Runx1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie Ets-Faktoren und mit Mitgliedern der Stat-, Cebp- und Gata-Familien.



Abb. 16: Genomweite Analyse der Runx1-DNA-Bindung in FDC-P1 Zellen. A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Die Bindung von Protein und DNA wurde fixiert, anschließend wurden die Zellen lysiert und die DNA mittels Sonifikation geschert. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels eines Runx1-spezifischen Antikörpers und ProteinA-gekoppelten Agarosebeats. Nach dem enzymatischen Abbau der Proteine wurden die eluierten DNA-Fragmente im Hochdurchsatzverfahren sequenziert. B) Abgleich der DNA-Bindungsstellen von endogenem Runx1 und überexprimiertem RUNX1-ERt2. Das Venn-Diagramm stellt die Übereinstimmung der *peaks* beider Analysen dar. C) Verteilung der Runx1-gebundenen Regionen in Relation zu potentiellen Zielgenen. Der nächstgelegene *peak* zu Genen, deren Expression entweder im Knockout oder im Überexpressionsmodell dereguliert war, wurde bestimmt. Basierend auf der Lokalisation dieser *peaks* zu den jeweiligen Genen wurden sie eingeteilt als 1) intra-gen (zwischen oder auf den Gengrenzen); 2) proximal (innerhalb 10 kp *upstream* oder *downstream*); 3) distal (zwischen 10 kb und 100 kb *upstream* oder *downstream*). 4) >100 kb von den Gengrenzen entfernt. D) Sequenzlogos der per *de novo*-Motivsuche identifizierten angereicherten Sequenzen an Runx1-Bindungsstellen.Die Frequenz der angereicherten Motive nahe der Runx1 *summits* (+75 bp) ist dargestellt (n=500) ebenso wie der E-Value.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Runx1-Zielgene in myeloischen Vorläuferzellen beschrieben werden. Durch Genexpresssionsanalysen in primären Runx1-defizienten und konditional Runx1-überexprimierenden (RUNX1-ERT2) Granulozyten-Monozyten-Progenitoren konnten 50 Gene ermittelt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Zielgene von Runx1 darstellen. Diese stellen vor allem Adhäsions- und Signaltransduktionsfaktoren dar. Weiterhin konnte für 30% aller identifizierten, potentiellen Runx1-Zielgene eine direkte Regulation durch Runx1 auf Grund der Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotor-/*Enhancer*region nachgewiesen werden. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Runx1 bei der Regulation seiner Zielgene nicht alle agiert, sondern Bestandteil regulatorischer Netzwerke bestehende aus mehreren Transkriptionsfaktoren wie Ets-, Cebp-, Stat-, Gata-Faktoren ist.

5.3 Implikation von RUNX1 in der Leukämogenese

Die bisherigen Untersuchungen haben verdeutlicht, dass Runx1 für die geregelte Differenzierung myeloischer Zellen eine große Rolle spielt. In Abwesenheit von Runx1 ist die myeloische Differenzierung zwar nicht blockiert, aber deutlich eingeschränkt.

Zudem treten in humanen Leukämien häufige *RUNX1*-Mutationen auf. Während Translokationen in erster Linie mit M2-AMLs assoziiert sind, treten Punktmutationen in bis zu 40% aller AML-M0-Patienten auf. Bei diesen *RUNX1*-Punktmutationen handelt es sich in den meisten Fällen um heterozygote, biallelische Mutationen, wobei ein Allel durch eine *nonsense* Mutation völlig zerstört ist, während das andere Allel für eine *RUNX1*-Mutante mit verminderter DNA-Bindungskapazität kodiert (Preudhomme, *et al.*, 2000). Die Funktion dieser DNA-Bindungsmutanten ist noch nicht endgültig geklärt. Neben der häufig postulierten dominant negativen Funktion wird in anderen Studien eine zusätzliche (onkogene) Funktion der Proteine vermutet (Cammenga, *et al.*, 2007; Schulz, 2009; unpublizierte Daten). Auch im Mausmodell führt die Inaktivierung von Runx1 nicht *per se* zu einer Leukämie (Jacob, *et al.*, 2010). Hieraus ergab sich die Hypothese, dass eine gewisse Runx1-Funktion nötig ist um eine Leukämie zu induzieren. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde diese Hypothese überprüft werden.

5.3.1 Etablierung eines induzierbaren in vivo RUNX1-Überexpressionssystems

Um zu überprüfen, ob für die Induktion einer Leukämie eine gewisse RUNX1-Aktivität notwendig ist, sollten in einem *in vivo*-Mausmodell in Runx1-defizienten Knochenmarkzellen (1) FLT3-ITD allein, (2) FLT3-ITD und die RUNX1-DNA-Bindungsmutante RUNX1^{R135G} und (3) FLT3-ITD und das wildtyp RUNX1-Protein überexprimiert werden. Hierzu wurden Runx1-deletierte Progenitoren aus 5-FU behandelten Mäuse mittels gammaretroviraler Vektoren mit

FLT3-ITD/BFP allein oder zusätzlich mit RUNX1-ERt2/eGFP, bzw. RUNX1^{R135G}-ERt2/eGFP transduziert (RUNX1/FLT3* bzw. RUNX1^{R135G}/FLT3*). Es folgte die intravenöse Transplantation der Zellen in letal bestrahlte C57BL/6-Empfängermäuse. Vier Wochen nach der Transplantation erfolgte die Aktivierung des jeweiligen RUNX1-Fusionsproteins durch Tamoxifengabe über das Futter (Abb. 17A). Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse hier zusammengefasst dargestellt sind.

Nach einem Beobachtungszeitraum von 250 Tagen waren 60% aller transplantierten Tiere verstorben, wobei die Penetranz der Erkrankungen und die Latenzzeiten sich deutlich unterschieden. In RUNX1/FLT3*-Empfängermäusen lag die Penetranz der Erkrankung bei 71% und die mittlere Überlebenszeit bei 107 Tagen. Die beiden anderen Kohorten wiesen deutlich geringere Penetranzen und signifikant verlängerte Überlebenszeiten auf (RUNX1^{R135G}/FLT3: 47%, 182 Tage; ERt2/ FLT3*: 57%, 173 Tage).

Die genauere Analyse der erkrankten Mäuse verdeutlichte die Korrelation unterschiedlicher Latenzzeiten mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen (Abb. 17B+C). Sieben, der neun verstorbenen RUNX1/FLT3*-Empfängermäuse, entwickelten eine akute myeloische Leukämie. Ein weiteres Tier verstarb sehr früh an einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN). Demgegenüber war die am häufigsten auftretende Erkrankung in den beiden anderen Kohorten ein Thymom. Vier von fünf Mäusen der RUNX1^{R135G}/FLT3*-Kohorte sowie sieben von acht ERt2/FLT3* Mäusen entwickelten nach einer Latenzzeit von 104 – 258 Tagen ein Thymom. In beiden Kohorten verstarb ebenfalls jeweils eine Maus wenige Monate nach der Transplantation an einer MPN (Abb. 17C). Zusätzlich zu diesen drei tamoxifenbehandelten Versuchsgruppen wurden Kontrollmäuse mit den transduzierten Zellen transplantiert, das RUNX1-Fusionsprotein jedoch nicht aktiviert. 50% dieser Kontrollmäuse verstarben ebenfalls innerhalb des Versuchszeitraums von 250 Tagen und entwickelten Thymome (n=5) und myeloproliferative Erkrankungen (n=2).

Da die transplantieren Runx1-defizienten Knochenmarkzellen jeweils mit zwei retroviralen Vektoren transduziert wurden, konnte es in den Empfängertieren sowohl zum Anwachsen einfach als auch doppelt transduzierter Zellen kommen. Aus diesem Grund wurden die Knochenmarkzellen aller erkrankten Mäuse auf die Expression der Reportergene *gfp* und *bfp* hin untersucht. Diese durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass das Auftreten der AML durch das Auswachsen RUNX1/FLT3* doppelt transduzierter Zellen bedingt war (KM: 32 - 78% GFP⁺BFP⁺). Bei allen beobachteten Thymomen hingegen handelte es sich um entartete, uninfizierte Zellen (KM: <4% infiziert). Die bei drei tamoxifenbehandelten und zwei Kontrolltieren beobachtete MPN war in einem Fall durch Expansion doppelt infizierter FLT3*/RUNX1^{R135G} exprimierender Zellen bedingt (KM: 92% BFP⁺GFP⁺). In vier Fällen kam es zum Auswachsen

von Zellen, die nur FLT3-ITD exprimierten (KM: 66% - 91% BFP⁺). Somit kann davon ausgangen werden, dass die Überexpression von FLT3-ITD allein ausreichend ist, um eine myeloproliferative Erkrankung auszulösen (Abb. 17D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von RUNX1 bei parallel konstitutiver Aktivierung des FLT3-Rezeptors (FLT3-ITD) in Runx1-deletierten Zellen nach kurzer Latenzzeit zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie führt. Hierfür scheint die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors von Bedeutung zu sein, da eine DNA-Bindungsmutante unter denselben Bedingungen nicht in der Lage war eine Leukämie zu induzieren. Weiterhin führte die Überexpression von FLT3-ITD allein mit einer geringen Pentranz (5 von 58) zu einer myeloproliferativen Neoplasie. In 80% der mit RUNX1^{R135G}/FLT3*, und 89% der mit ERt2/FLT3* transplantierten Mäuse, wurden die transduzierten Zellen von nicht infizierten, malignen Zellen überwachsen, die so zu einem Thymom führte. Alle drei Erkrankungen sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.



Abb. 17 Überexpression von RUNX1 bzw. RUNX1^{R135G} und FLT3-ITD im *Runx1*^{Δ/Δ}-Hintergrund. A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. *Runx1*^{Δ/Δ} Mäuse wurden mit 5-FU behandelt, die Knochenmarkzellen isoliert und mittels retroviraler Vektoren mit RUNX1-ERt2/eGFP- bzw. RUNX1^{R135G}-ERt2/eGFP- bzw. ERt2/eGFP- und FLT3-ITD/BFP transduziert. Die infizierten Zellen wurden intravenös in letal bestrahlte B6-Mäuse transplantiert. Ab Woche 2 nach der Transplantation erhielten die Mäuse tamoxifenhaltiges Futter. B) Kumulatives Überleben der transplantierten Empfängertiere gegen die Zeit (Tage). Die unterschiedlichen Erkrankungen sind anhand farbiger Symbole indiziert. Das durchschnittliche Überleben der RUNX1/FLT3-Empängermäuse war gegenüber den RUNX1^{R135G}/FLT3- und ERt2/FLT3-Empfängermäuse deutlich verringert. C) Relative Quantifizierung der in den einzelnen Kohorten aufgetretenen Erkrankungen. Der Farbcode entspricht der in B) dargestellten Legende.

5.3.2 Histologische Charakterisierung der einzelnen Krankheitsbilder

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die drei auftretenden Krankheiten auf die Transformation unterschiedlich transduzierter bzw. nicht transduzierter Zellen zurückzuführen sind, wurden diese unterschiedlichen Krankheitsbilder genauer charakterisiert. Bereits während der Sektion der Mäuse deuteten makroskopisch erkennbare Veränderungen auf unterschiedliche Erkrankungen hin. Neben dem deutlich vergrößerten Thymus, der ausschließlich in

Mäusen auftrat, die unter Thymomen litten, war die akute myeloische Leukämie durch eine stark ausgeprägte Hepatosplenomegalie gekennzeichnet. Das durchschnittliche Milzgewicht dieser Mäuse lag bei 661 mg. Auch das Thymom führte in zehn von zwölf Fällen zu einer deutlichen Vergrößerung der Milz auf über 200 mg. Zwei Mäuse zeigten kein erhöhtes Milzgewicht. Auch das dritte Krankheitsbild, die MPN, hatte Vergrößerung der Milz auf durchschnittlich 306 mg zur Folge (Abb. 18A). Bei Kontrollmäusen, die ebenfalls transplantiert wurden, jedoch keine Erkrankungserscheinungen aufwiesen, lag das Milzgewicht zwischen 110 und 197 mg. Die Analyse der Blutparameter ergab, dass alle drei Erkrankungen in unterschiedlichem Maße eine Erhöhung der Leukozytenzahlen über den Normalwert (1,2 - 4,86 x 10⁶/ml) induzierten, was auf eine Ausschwemmung der malignen Zellen in das periphere Blut hindeutet (Abb. 18B, links). Da die übermäßige Proliferation von Tumorzellen häufig bewirkt, dass Vorläufer anderer Zelltypen verdrängt werden, treten Anämien häufig als Begleiterscheinungen bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Allerdings führte keine der drei Erkrankungen zu einer signifikanten Verminderung der Erythrozyten bzw. des Hämoglobingehalts (Abb. 18B, rechts) im peripheren Blut der Versuchstiere. Mikroskopische Untersuchungen gefärbter Blutausstriche bestätigten die durch alle drei Erkrankungen ausgelöste Leukozytose und verdeutlichten die phänotypischen Unterschiede der im Blut akkumulierenden Leukozyten. Die leukämischen Blasten der AML waren groß, wiesen einen großen Nukleus und ein stark basophiles Zytoplasma auf, zeigten jedoch keinerlei Differenzierungsmerkmale. Die Lymphoblasten waren auf Grund der Dichte des Nukleus und dem geringen Zytoplasmaanteil deutlich als solche zu erkennen. Demgegenüber waren myeloide Neoplasien durch ein vermehrtes Auftreten von Promyelozyten und Myelozyten im Blut gekennzeichnet (vgl. Abb. 18C).



Abb. 18: Analyse des Milzgewichts und der Blutparameter/ Blutzellmorphologie erkrankter Mäuse in Abhängigkeit von dem beobachteten Krankheitsbild. A) Darstellung des Milzgewichtes. Im Mittel induzierten alle drei Erkrankungen eine signifiknate Erhöhung des Milzgewichts. B) Darstellung der Leukozytenzahlen (links) und des Hämoglobingehalts (rechts) im peripheren Blut. Im Mittel führten alle drei Erkrankungen zu einer Erhöhung der Leukozytenzahlen, hatten jedoch keinen Einfluss auf den Hämoglobingehalt im Blut. Grau unterlegte Bereiche kennzeichnen die Normalwerte für den jeweiligen Parameter ermittelt anhand der Werte transplantierter, nicht erkrankter Mäuse. C) Zytologische Untersuchungen der Blutausstriche dreier erkrankter Mäuse. Die Pfeile deuten auf die undifferenzierten Blasten der myeloischen und lymphatischen Zellreihe hin. Der Pfeilkopf kennzeichnet einen Promyelozyten. Zudem waren in der MPN granulozytäre Vorläufer aller Differenzierungsstadien vorhanden. Pappenheimfärbung; die Bilder wurden in 630facher Vergrößerung aufgenommen; Objektiv 63 x; Okular 10 x.

Histologische Untersuchungen demonstrierten, dass akute myeloische Leukämie und myeloproliferative Neoplasien sich vor allem im Knochenmark, in der Milz und der Leber manifestierten (vgl. Tab. 3). Bei akuten Formen beider Erkrankungen konnte zusätzlich eine starke Beteiligung der Lungen festgestellt werden. Thymomzellen infiltrierten ebenfalls Knochenmark, Milz und Leber, waren jedoch zusätzlich in hohem Maße in Lungen und Nieren nachweisbar (Tab. 3).

Gewebe	AML	Thymom	MPN
Knochenmark	ја	ja (→nekrotisch)	ја
IK-Muskulatur	infiltiert	unbeteiligt	Infiltriert
Milz	diffus	Diffuse	fokal → diffuse
Struktur	zerstört	zerstört	zerstört
Leber	diffus	fokal → diffus	fokal
Lunge	schwach \rightarrow stark	Ja	schwach →stark
Niere	nein	Ja	nein
Thymus	nein	Ja	nein
Lymphknoten	nein	Ja	nein
Herz	nein	Nein	nein

Tab. 3: Beteiligung hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Organe an den verschiedenen Erkrankungen. IK-Muskulatur: Interkostalmuskulatur

Wie schon an den Blutwerten zu erkennen war traten alle drei Erkrankungen mit unterschiedlichen Ausprägungen auf. Um die Charakteristika der verschiedenen Erkrankungen darzustellen sind im Folgenden Schnitte durch das Leber- und Nierengewebe je einer akut erkrankten Maus im Vergleich zu einer gesunden C57BL/6 Maus dargestellt (Abb. 19). Die Leberschnitte belegen, dass alle drei Erkrankungen zu einer starken Infiltration des Lebergewebes führten. Sowohl die akute myeloische Leukämie, als auch das Thymom bedingten eine diffuse Infiltration der Leber, zum Teil begleitet von einer Leberparenchymnekrose. Die myeloproliferativen Neoplasien hingegen induzierten eine nicht ganz so starke, eher fokale Beteiligung der Leber. Eine Beteiligung der Niere wurde nur durch die lymphatischen Blasten des Thymoms ausgelöst. Der Schnitt durch die Niere dieser Maus verdeutlicht die starke interstitielle Infiltration von Nierencortex und -mark. Die Nieren akut und chronisch neoplastischer Mäuse wiesen hingegen eine normale Struktur ohne Infiltrationen auf.



Abb. 19: Histologischer Befund der Milzen und Nieren erkrankter Mäuse und einer Kontrollmaus (unten). Links) Schnitte durch das Lebergewebe. In den Lebern an AML und Thymomen erkrankter Mäuse kommt es zu einer diffusen Infiltration der malignen Zellen. Myeloproliferative Neoplasien induzieren einen weniger starken Befall der Leber, die fokalen portalen (Pfeilköpfe) und sinusiodalen (Pfeile) Infiltrate sind gekennzeichnet. Im Vergleich hierzu ist die Leber eines gesunden Kontrolltiers.

Rechts) Schnitte durch das Nierengewebe. Die Nieren akuter und chronisch neoplatischer Mäuse waren unauffällig, Thymome hingegen bewirkten eine starke Infiltration der Lymphoblasten in Cortex und Mark. HE-Färbungen; die Bilder wurden in 250facher Vergrößerung aufgenommen; Objektiv 25x; Okular 10x.

Wie bereits zuvor beschrieben handelte es sich bei dem Thymomen um entartete uninfizierte Zellen. Die MPN waren durch eine verstärkte Proliferation FLT3-ITD exprimierender Zellen bedingt, traten aber mit einer relativ geringen Frequenz auf. Die akuten myeloische Leukämien hingegen waren spezifisch für RUNX1-ERt2/FLT3* doppelt transduzierte Zellen. Sie traten bei mindestens 66% der Mäuse dieser Kohorte auf und waren daher von besonderem Interesse. Im Folgenden wird der histologische Befund dieser Mäuse anhand der Organschnitte einer exemplarischen Maus genauer dargestellt. Die Hyperproliferation der leukämischen Blasten bewirkte die Infiltration von Sternum, Milz, Leber und Lungengewebe (vgl. Tab. 3). Im Sternum führte die Invasion der Blasten zu einer Verdrängung anderer hämatopoetischer Zellen, sodass die komplette Knochenmakshöhle mit monomorphen Blasten gefüllt war. Ferner proliferierten diese malignen Zellen so stark, dass sie die Knochenmarkhöhle durchbrachen und in die, das Sternum umgebende, interkostale Muskulatur einwanderten (Abb. 20 oben, Pfeilkopf). Auch die Milz wies eine starke Tumorzellinfiltration auf. Hierdurch kam es zu einer völligen Strukturauflösung des Organes, sodass die rote Pulpa nicht mehr von den Malpighi-Körperchen der weißen Pulpa unterschieden werden konnte (Abb 15 mitte rechts, Pfeile). Weiterhin konnten in den Lungen erkrankter Mäuse eine deutliche Verbreiterung der Alveolarsepten durch die invasiven Blasten festgestellt werden (Abb15 unten).



Abb. 20: Histologischer Befund einer leukämischen Maus (21-#13) (links) im Vergleich zu einem Kontrollmaus (rechts). Oben) Die Infiltration der Blasten führt zum Durchbrechen der Knochenmarkhöhle und zur Invasion der Tumorzellen in die Interkostalmuskulatur (Pfeilkopf). Mitte) Weiße und rote Pulpa der Milz sind durch die Infiltration der Tumorzellen nicht mehr zu definieren. Pfeile in dem Milzschnitt der Kontrollmaus indizieren die Malpighi-Körperchen der weißen Pulpa. Unten) Die Invasion der Blasten führt zu einer deutlichen Verbreiterung der Alveolarsepten und zum Erscheinen vieler eosinophiler Makrophagen in den Alveolen. Zusätzlich erschienen die Alveolen reduziert. HE-Färbungen; Die Bilder wurden in 250facher bzw. 100facher (Milz) Vergrößerung aufgenommen. Objektiv 25x bzw. 10x ; Okular 10x.

5.3.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der einzelnen Krankheitsbilder

Zur Charakterisierung des Immunphänotyps der Tumorzell-Populationen wurden diese durchflusszytometrisch auf die Expression von Oberflächenantigenen untersucht. Im Folgenden werden die Charakteristika der unterschiedlichen Krankheitsbilder aufgeführt. Detaillierte Daten der durchflusszytometrischen Analyse jedes einzelnen Versuchstieres sind im Anhang aufgeführt.

5.3.3.1 Thymome entstehen unabhängig von der Knochenmarktransplantation

Im Laufe der fortschreitenden T-Zelldifferenzierung kommt es zur Expression des T-Zell-Rezeptors und seiner Ko-Rezeptoren, CD4 und CD8. Hierbei differenzieren CD4-/CD8-negative Zellen (DN, *double negative*) zu doppelt positiven Zellen (DP), die beide Rezeptoren exprimieren. Der nächste Entwicklungsschritt ist gekennzeichnet durch die zusätzliche Expression des T-Zellrezeptor-Komplexes (TZR und CD3). Während der Reifung zu den CD4positiven T-Helferzellen (SP CD4, *single positive CD4*) bzw. CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (SP CD8, *single positive CD8*) wird die Expression des jeweils anderen Ko-Rezeptors inhibiert (vgl. Abb. 21A).

Thymome waren die am häufigsten auftretenden Erkrankungen der transplantierten Mäuse. Sowohl in RUNX1^{R135G}/ FLT3* als auch in ERt2/FLT3* Empfängermäusen lag der Anteil der Mäuse, die an dieser Erkrankung des lymphoiden Systems verstarben, bei >80%. Die durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark, Thymus, Milz und Leber ergaben, dass der Anteil transduzierter Zellen in allen Organen unter 4% lag. Die Thymome mussten also die Folge der Transformation nicht infizierter Zellen sein. Weiterhin zeigte sich, dass die Expression der Differenzierungsmarker CD4, CD8 und CD3 innerhalb der erkrankten Mäuse sehr divers war. Bei vier der neun analysierten Mäuse handelte es sich bei den Tumorzellen um relativ unreife, transformierte DP-Zellen (Abb. 21B oben). Zwei weitere Mäuse zeigten eine Akkumulation weiter ausdifferenzierter CD4 und CD3 koexprimierender Vorläufer. CD8 und CD3 positive Blasten konnte bei drei Mäusen nachgewiesen werden. Unabhängig von dem Differenzierungsstadium machten diese Blasten zum Zeitpunkt der Erkrankung bei einem Großteil der Mäuse über 80% der Zellen in KM, Thymus, Milz und Leber aus. Der im Blut nachgewiesene Anteil an T-Zell war von Maus zu Maus sehr divergent (Abb. 21C). Alle Tumorzellen differenzierten mindestens bis zum Stadium der DP T-Zellen. Der Knockout von Runx1 führt hingegen zu einer Blockade der T-Zelldifferenzierung während des DN Stadiums (Ichikawa, et al., 2004). Somit ist anzunehmen, dass in den Tumorzellen keine Inaktivierung des Runx1-Locus stattgefunden hat. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde durch eine PCR- Reaktion semi-quantitativ die Frequenz des Wildtyp-Allels zu dem Runx1-deletierten-Allel bestimmt. Hierzu wurde aus den Milzzellen erkrankter Mäuse gDNA isoliert und diese mit spezifischen, an das gefloxte bzw. an das Wildtyp-Allel von *Runx1*, bindenden Primern amplifiziert. Als Kontrolle diente gDNA aus der Milz einer leukämischen Maus, sowie einer C57BL/6-Maus. Diese Analyse zeigte, dass es sich bei den malignen T-Zellen um Runx1-exprimierende Zellen handelte. Hierbei könnte es sich entweder um residuale T-Zellen der Empfängermäuse handeln, oder um Zellen der Spendermäuse die der Cre-induzierten Runx1-Inaktivierung entgangen sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die auftretenden Thymome durch die Akkumulation unterschiedlich stark differenzierter T-Zellen bedingt waren. Diese Erkrankung war jedoch von der Runx1-Inaktivierung und der Transduktion der Zellen unabhängig. Einen möglichen Auslöser der Erkrankung stellt die Bestrahlung der Empfängermäuse dar.



Abb. 21: Charakterisierung der Thymome. A) Schematische Darstellung der Oberflächenantigenexpression während der T-Zelldifferenzierung B) Repäsentative durchflusszytometrische Analysen von Knochenmark- und Thymuszellen eines $CD4^+$ $CD8^+$ Thymoms und eines $CD8^+$ $CD3^+$ Thymoms C) Relative Quantifizierung der Tumorzellen. Der Anteil an Tumorzellen in den aufgeführten Organen ist für jede analysierte Maus als ein Quadrat dargestellt. Angegeben ist der Median für die angegebene Stichprobengröße (n). D) 2% iges Agarosegel der PRC-Amplifikate zum Nachweis der *Excision* von *Runx1*. Die angegebenen Fraktionen wurden isoliert, gDNA isoliert und per PCR amplifizert. Das Amplifikat des wt-Allels resultiert in einer 260 bp Bande, das durch CRE-Aktivität veränderte Allel hingegen in einer 382 bp Bande.

5.3.3.2 FLT3-ITD induziert im *Runx1^{-/-}* Hintergrund eine myeloproliferative Neoplasien

Die Überexpression von FLT3-ITD induzierte in einer kleinen Kohorte von fünf Mäusen eine myeloproliferative Erkrankung. Anhand histologischer Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass diese sich vor allem im Knochenmark, in der Milz und in der Leber manifestierte. Dieser Befund konnte auch mittels durchflusszytometrischer Analysen bestätigt werden. Alle drei Organe wiesen einen hohen Anteil FLT3-ITD exprimierender Zellen auf, die wiederum zu mehr als 80% positiv für die myeloiden Oberflächenantigene CD11b und Gr1 waren. In transplantierten, nicht erkrankten Kontrollmäusen lag der Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ Zellen im Knochenmark bei durchschnittlich 50 % (n=4). Neben der CD11b⁺/Gr1⁺ Population war in der Milz eine zusätzliche Population schwach CD11b-exprimierender Zellen (CD11^{low}Gr1⁺) erkennbar, bei der es sich um die histologisch identifizierten Myeloblasten handeln könnte.



Abb. 22: Charakterisierung der myeloproliferativen Neoplasie. A) Die repräsentative durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark- und Milzzellen einer chronisch neoplatischen Maus (20#20) zeigt eine Vergrößerung des myeloiden Kompartiments (CD11b⁺Gr1⁺) im Vergleich zu einer transplantierten, nicht erkrankten Maus (20-#24). **B)** Links: relative Quantifizierung der Tumorzellen. Der Anteil der FLT3*-exprimierenden Zellen im KM und in der Milz beträgt 81% bzw. 78%. **Rechts:** relative Quantifizierung des Anteils myeloider Zellen innerhalb der Tumorzellpopulation. Der Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ Tumorzellen innerhalb der Population BFP⁺ (FLT3*) Zellen im Knochenmark und in der Milz ist für jede analysierte Maus als ein Dreieck (FLT3*⁺)/ Punkt (FLT3*⁺/RUNX1^{R135+}) dargestellt. Angegeben ist der Median für die angegebene Stichprobengröße (n).

5.3.3.3 RUNX1 und FLT3-ITD induzieren im *Runx1^{-/-}* Hintergrund akute myeloische Leukämien

Alle analysierten RUNX1/FLT3* Empfängermäuse entwickelten innerhalb einer relativ kurzen Latenzzeit eine akute Leukämie. Gekennzeichnet war diese durch die Infiltration monomorpher Blasten in Knochenmark, Milz und Leber. Durchflusszytometrisch konnte ein hoher Anteil doppelt transduzierter Zellen von durchschnittlich 63% im Knochenmark und >75%

in Milz und Leber bestätigt werden (Abb. 23A). Da sich anhand der histologischen Präparate kein genauer Befund über den Differenzierungsstatus der Blasten erstellen ließ, wurden die leukämischen RUNX1/FLT3* positiven Zellen auf die Expression typischer Oberflächenantigene aller hämatopoetischen Linien hin untersucht. Diese zeigte jedoch weder einer Expression der auf frühen Stamm- und Progenitorzellen exprimierten Antigene Sca und Kit, noch exprimierten sie für myeloische (CD11b, Gr1), lymphoide (CD4, CD8, CD19, B220) oder erythroide Zellen typische Rezeptoren (Ter119) (Abb. 23B).



Abb. 23: Charakterisierung der akuten myeloischen Leukämie. A) Relative Quantifizierung der Tumorzellen. Der Anteil RUNX1/FLT3*-exprimierender Zellen im Knochenmark und in der Milz ist für jede analysierte Maus ist als ein Punkt dargestellt. Angegeben ist der Median für die angegebene Stichprobengröße (n). Der Anteil der RUNX1/FLT3*-exprimierenden Zellen in KM, Milz und Leber liegt im Mittel bei > 60%, im peripheren Blut bei 43%. Eine an einer AML erkrankten Maus zeigte nur die Expression von GFP (RUNX1-ERt2) (21-#10). Southern Blot-Analyen bestätigten jedoch die Integration des FLT3-ITD/BFP-Provirus (vgl. Anhang) **B)** Die repäsentative durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark- und Milzzellen einer an AML erkrankten Maus (21-#13) zeigt, dass die leukämischen Blasten für keines der analysierten Oberflächenantigene positiv sind.

Die zytologische Analyse der akkumulierenden Zellen deutet auf Grund der Größe der Zellen, dem großen Zellkern und dem basophilen Zytoplasma zwar darauf hin, dass es sich hierbei um unreife Blasten handelte, doch weder histologisch noch immunhistochemisch konnte die Linienzugehörigkeit der Zellen geklärt werden. Um dieses zu ermöglichen wurde das Genexpressionsprofil der Tumorzellen analysiert. Hierzu wurden aus der Milz einer erkrankten Maus (21-#13) mRNA extrahiert und diese im Hochdurchsatzverfahren sequenziert. Die Expression der Transkripte einzelner Gene wurde als FPKW-Wert (*fragments per kilobase per million sequenced reads*) angegeben. Dieser ergibt sich aus der Anzahl der mit einem bestimmten Transkript alignierten Reads, normalisiert über die Anzahl aller alignierten Reads und die Länge des entsprechenden Transkripts. Unter Verwendung der ImmGen Datenbank (Heng and Painter, 2008) wurde das Expressionsprofil der Blasten anschließend mit den Expressionsprofilen früher myeloischer und lymphatischer Progenitoren (CMP, CLP) verglichen. Hierzu

wurden die 150 Gene ermittelt, deren Expression zwischen CMPs und CLPs am stärksten divergiert. Hiervon wurden 52 Gene in CMPs und 98 in CLPs stark exprimiert. Sieben Gene mit einer starken Expression in erythroiden Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen, um mögliche Kontamination durch Erythrozyten der Milz auszuschließen. Für die restlichen Gene wurde der FPKM-Wert in den leukämischen Blasten ermittelt. Diese lagen zwischen 0 und 315. Rund 44% der, in CMP stark exprimierten Gene wurden auch in den leukämischen Blasten hoch exprimiert. Demgegenüber zeigten lediglich 7% der in CLP stark exprimierten Gene auch in den Blasten ein hohes Expressionsniveau (Abb. 24). Im Mittel lag der FPKM-Wert der CMP-spezifischen Gene bei 50,9, jener der CLP-spezifischen Gene hingegen lediglich bei 6,9. Anhand des Genexpressionsprofils der leukämischen Blasten konnte somit gezeigt werden, dass es sich hierbei um frühe myeloische Vorläufer handelt.



Abb. 24: Vergleich der Genexpressionsprofile leukämischer Blasten und früher Vorläufer. Mittels der ImmGen Datenbank wurden die 150 Gene bestimmt deren Expression zwischen CLP und CMP am stärksten variiert (n=150). Gene die zusätzlich eine hohe Expression in MEPs im Vergleich zu CMPs aufwiesen wurden ausgeschlossen (n=7). 6 Gene waren nicht annnotiert. Dargestellt sind Fraktionen der CLP- und CMP-spezifischen Gene mit FPKM-Werten < oder > 20 in den leukämischen Blasten. Das Genexpressionsprofil der leukämischen Zellen wiese eine starke Ähnlichkeit zur dem Expressionsprofil von CMPs auf.

Zusammenfassend hat das induzierbare *in vivo*-RUNX1-Expressionssystem gezeigt, dass für die Leukämogenese eine gewisse verbleibende RUNX1-Aktivität nötig ist. Während die Expression der RUNX1-DNA-Bindungsmutante R135G zusammen mit FLT3-ITD in Runx1deletieren Knochenmarkzellen nicht zu einer Leukämie führte, konnte durch die Überexpression des wildtyp RUNX1 Proteins zusammen mit FLT3-ITD eine akute myeloische Leukämie induziert werden. Ferner führte die Überexpression von FLT3-ITD in einigen Fällen zu eine myeloproliferativen Neoplasie. Viele der Versuchstiere erkrankten an einem Thymom, dieses war jedoch nicht direkt durch die Transplantation bedingt, sondern vermutlich eine Konsequenz der Bestrahlung bzw. einer daraus resultierenden Immundefizienz.

6 Diskussion

Das für den Transkriptionsfaktor *RUNX1* codierende Gen ist eines der am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene in akuten Leukämien. Fast 30% aller AML-Patienten weisen Translokationen, Deletionen oder Punktmutationen innerhalb des *RUNX1*-Locus auf. Eine hohe Inzidenz von *RUNX1*-Mutationen tritt insbesondere in AML-M0 auf, einer Leukämie, die durch einen sehr unreifen Phänotyp der akkumulierenden Myeloblasten gekennzeichnet ist. Dennoch ist nur wenig über die Funktion des Transkriptionsfaktors in der myeloischen Entwicklung bekannt. Bisherige Studien haben sich vor allem auf Untersuchungen der Rolle von Runx1 in hämatopoetischen Stammzellen konzentriert. Da Progenitoren jedoch, ebenso wie Stammzellen, das Ziel transformierender Mutationen darstellen können (Cozzio, *et al.*, 2003; Minami, *et al.*, 2008), war es das Ziel dieser Arbeit mithilfe eines konditionalen *Runx1* Knockout Mausmodells die Funktion von Runx1 während der frühen Myelopoese genauer zu charakterisieren. Weiterhin sollten Zielgene des Transkriptionsfaktors identifiziert werden, deren Deregulation für die Leukämogenese maßgeblich sein könnte. Hierdurch sollten neue Erkenntnisse über die Pathogenese *RUNX1*-mutierter AMLs erlangt werden, um so langfristig gezielte therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich (1) der Funktion von Runx1 in der myeloischen Entwicklung, (2) potentieller Runx1-Zielgene und (3) der Funktion von Runx1 bei der Leukämogenese sollen im Folgenden vergleichende mit bereits etablierten Hypothesen zur Funktion von Runx1 in der Hämatopoese diskutiert werden.

6.1 Die Tumorsuppressorfunktion von Runx1 in myeloischen Progenitoren

6.1.1 Der Verlust von Runx1 bewirkt die Expansion des myeloischen Progenitorkompartiments

In ersten Experimenten wurde, durch die Analyse der Knochenmarkprogenitoren $Runx1^{+/+}$ und $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Mäuse die Bedeutsamkeit des Transkriptionsfaktors in unterschiedlichen myeloischen Progenitoren analysiert. Durchflusszytometrische Analysen demonstrierten, dass die Deletion von Runx1 eine Expansion des gesamten myeloischen Progenitorkompartiments bewirkte, wobei sowohl die Anzahl der MEPs, als auch die Anzahl der GMPs deutlich erhöht war. Die Expansion der GMPs konnte mittels funktionaler *in vitro*-Differenzierungsanalysen weiter bestätigt werden, in denen $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMPs ein erhöhtes Potential zur Ausbildung von Kolonien aufwiesen.

Eine, durch die Deletion von Runx1 induzierte, Expansion der myeloischen Progenitoren und des GMP-Kompartiments wurde bereits mehrfach beschrieben (Ichikawa, *et al.*, 2004; Growney, *et al.*, 2005; Putz, *et al.*, 2006; Guo, *et al.*, 2013). Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals der Beweis erbracht werden, dass die erhöhte Anzahl an GMPs nicht ausschließlich die Konsequenz der erhöhten Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen in *Runx1*^{$\Delta\Delta$} Mäusen ist, sondern auch auf einen intrinsischen Defekt dieser Progenitoren zurückzuführen ist.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Vergrößerung des MEP-Kompartiments in *Runx1*^{Δ/Δ} Mäusen beschrieben werden. In vorherigen Studien hingegen wurde bislang kein Einfluss von Runx1 auf diese Progenitoren festgestellt (Ichikawa, *et al.*, 2004; Growney, *et al.*, 2005; Guo, *et al.*, 2013). Diese Unterschiede könnten möglicherweise auf unterschiedlichen Strategien zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der Progenitoren beruhen (Akashi, *et al.*, 2000; Pronk, *et al.*, 2007). Um die Funktion von Runx1 im MEP-Kompartiment zu bestätigten sind zwar weitere Analysen notwendig, bedenkt man allerdings, dass der Verlust von Runx1 zu einer Blockade der megakaryozytären Entwicklung führt (Ichikawa, *et al.*, 2004; Growney, *et al.*, 2005; Putz, *et al.*, 2006), scheint eine Expansion der vorgeschalteten MEPs, durch möglicherweise fehlerhafte Rückkopplungseffekte, durchaus plausibel.

6.1.2 Runx1 ist für die Differenzierung myelosicher Progenitoren nicht essenziell, unterstützt diese jedoch

Um weiterhin die Funktionalität der expandierten, myeloischen Progenitoren zu analysieren wurden i*n vitro*-Differenzierungsanalysen Runx1-exprimierender und -deletierter GMPs durchgeführt. Hieraus ging eine deutlich verminderte Ausreifung der *Runx1*^{Δ/Δ} Kulturen gegenüber den Kontrollkulturen hervor. Ferner bestätigten durchflusszytometrische Analysen des Knochenmarks und des Bluts auch *in vivo* ein vermehrtes Auftreten unreifer myeloischer Zellen in *Runx1*^{Δ/Δ} Mäusen, im Vergleich zu *Runx1*^{+/+} Mäusen. Allerdings konnten in diesen Mäusen auch reife Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden.

Aus diesen Resultaten lässt sich der Schluss ziehen, dass der Verlust von Runx1 zwar keine vollständige Blockade der myeloischen Differenzierung induziert, jedoch die Kinetik oder die Wirksamkeit dieses Differenzierungsprozesses erheblich beeinträchtigt. Diese Hypothese impliziert, dass die unreifen myeloischen $Runx1^{\Delta/\Delta}$ Zellen in der Lage sind terminal auszudifferenzieren. Um dieses zu überprüfen wurden $Runx1^{\Delta/\Delta}$ GMPs über einen längeren Zeitraum kultiviert und die Differenzierung der Zellen analysiert. Allerdings konnten in diesem ersten Experiment nur wenig terminal differenzierten myeloischen Zellen nachgewiesen werden, sodass weitere Analysen nötig sind, um den genauen Mechanismus, der zur Beeinträchtigung der myeloischen Differenzierung führt, zu charakterisiern.

Interessanterweise bestätigt jedoch eine gerade veröffentlichte Studie ebenfalls eine Implikation von Runx1 in der myeloischen Differenzierung. Diese Arbeit zeigt, dass eine erhöhte Runx1-Expression in humanen, multipotenten Vorläuferzellen die myeloische Differenzierung induziert (Goyama, *et al.*, 2013).

Wie aber kann Runx1 die Differenzierung myeloische Zellen unterstützen? Differenzierungsprozesse werden durch ein komplexes Zusammenspiel von zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren und extrinsischen Faktoren, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert. Diese extrinsischen Faktoren binden, um Proliferations- und Differenzierungsförderne Signalwege in der Zelle induzieren zu können, an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Für die Entwicklung myeloischer Zellen ist, unter anderem die Bindung von M-CSF an den auf myeloisch-determinierten Zellen exprimierten M-CSF-Rezeptor von Bedeutung. Die Expression dieses Rezeptors wiederum, wird direkt und synergistisch von Runx1, Pu.1 und C/ebpa reguliert, sodass eine Inaktivierung von Runx1 zu einer verminderten Aktivierung des Promotors führen könnte. Zudem erfolgt die Bindung von Runx1 und C/ebpa kooperativ. Die Abwesenheit von Runx1 könnte somit gleichzeitig die Bindungsaffinität von C/ebpa an den Promotoren reduzieren (Zhang, et al., 1994; Zhang, et al., 1996). Dieses führt zu einer verminderten Expression des Rezeptors, einer verminderten Aktivierung nachgeschalteter Signalwege und eventuell zu einer verzögerten Differenzierung der Zelle. Welche bedeutungsvolle Funktion Runx1 für die Aktivierung des M-CSF-Rezeptors hat spiegelt sich auch darin wieder, dass eine verminderte Runx1-Expression in myeloischen Progenitoren die Rekrutierung eines Ko-Repressorkomplexes durch Pu.1 an den Promotor des M-CSR-Rezeptorgens zur Folge hat (Hu, et al., 2011).

6.1.3 Runx1 hat keinen Einfluss auf die Differenzierungsentscheidung zwischen der granulozytären und der monozytären Linie

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert, ob Runx1 die Differenzierungsentscheidung zwischen der granulozytären und der monozytären Linie beeinflusst. Hinweise auf eine Implikation von Runx1 bei diesem Prozess lieferten *in vitro*-Differenzierungsanalysen, in denen die Runx1-Inaktivierung die monozytäre Reifung etwas stärker zu beeinträchtigen schien, als die granulozytäre Reifung. Dieser Effekt konnte jedoch durch *in vivo*-Analysen, in denen das Verhältnis von Monozyten zu Granulozyten im Knochenmark und im Blut von *Runx1*^{Δ/Δ} Mäusen, im Vergleich zu *Runx1*^{+/+} Mäusen analysiert wurde, nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis ist konträr zu der von Guo *et al.* (2013) aufgestellten These, dass die Inaktivierung von Runx1 zu einer vermehrten Monopoese auf Kosten der Granulopoese führt. Diese Behauptung stützt der Autor auf durchflusszytometrische Analysen Runx1-exprimierender und -deletierter Zellen aus Methylzelluloseklonierungen. In diesen Experimenten führte die Inaktivierung von Runx1 zu einer verminderten Expression des Oberflächenantigens Gr1. Allerdings ist das Epitop, das der, für diese Analysen verwendete Antikörper erkennt, sowohl Bestandteil des granulozytär exprimierten Ly6g-Antigens, als auch des monozytär exprimierten Ly6c-Anitgens. Sodass die gewählte Methode unzureichend ist, um eine Aussage über das Verhältnis von Granulozyten zu Monozyten treffen zu können. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden Ly6c- bzw. Ly6g-spezifische Antikörper verwendet, um zwischen beiden Reifungslinien zu differenzieren. Weiterhin wurden für die Analysen der vorliegenden Arbeit die biopotente GMP-Population isoliert um deren Differenzierungskapazität zu analysieren. In der Arbeit von Guo *et al.* (2013) hingegen wurden die Zellen des kompletten Knochenmarks analysiert wurden. Eine solch heterogene Zellpopulation kann die Ergebnisse eventuell beeinflussen, sodass beide Experimente nicht vollständig vergleichbar sind.

Auch der von Guo *et al.* (2013) postulierte Mechanismus zur Inhibition der Granulopoese ist kritisch zu betrachten. Der Autor behauptet der Verlust von Runx1 bewirke eine verminderte Cebpa-Expression, was wiederum eine Beeinträchtigung der granulozytären Entwicklung zur Folge habe, sodass es zu einer kompensatorisch bedingten, vermehrten Monopoese kommt. Allerdings zeigen Analysen derselben Studie, dass die Deletion von Runx1 in der entscheidenden GMP-Population lediglich zu einer schwachen Reduktion des *Cebpa*-Transkripts führte. Auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalysen bestätigen eine nur sehr schwache Regulation von *Cebpa* durch die Inaktivierung von Runx1. Hinzu kommt, dass C/epb α zwar im *in-vitro*-Modell die granulozytäre Differenzierung unterschiedlicher bipotenter Vorläuferzelllinien induziert (Radomska, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 1999; Wang and Friedman, 2002), in frühen Knochenmarkprogenitoren jedoch die Monopoese fördert (Wang, *et al.*, 2006). Nicht außer Acht zu lassen ist auch, dass *Runx1*^{Δ/Δ} GMPs ebenfalls eine verminderte Pu.1-Expression aufwiesen (Guo, *et al.*, 2013). Geringe Pu.1-Konzentrationen fördern allerdings sowohl in bipotenter Vorläuferzellen als auch im Mausmodell die granulozytäre Differenzierung (Dakic, *et al.*, 2005; Rosenbauer, *et al.*, 2005; Huang, *et al.*, 2008).

6.2 Zielgene von Runx1 in frühen myeloischen Progenitoren

Um die Funktion von Runx1 in myeloischen Progenitoren weiter zu charakterisieren wurden im zweiten Teil dieser Arbeit potentielle Zielgene identifiziert. Durch die Kombination von

Genexpressionsanalysen Runx1-deletierter und *RUNX1*-überexprimierender primärer myeloischer Progenitoren sowie die zusätzliche Analyse genomweiter Runx1-Bindungsstellen war es erstmals möglich direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors in frühen myeloischen Zellen zu beschreiben.

6.2.1 Runx1 reguliert die Expression wichtiger Knochenmarknischenfaktoren

Durch den Vergleich gesamtgenomischer Expressionsanalysen, primärer myeloischer Progenitoren, in denen Runx1 entweder konditional ausgeschaltet wurde, oder die zur Überexpression von RUNX1 manipuliert wurden, konnten, unter Anwendung stringenter Kriterien, 50 reziprok regulierte Gene identifiziert werden. Funktionale Genannotationsanalysen wiesen auf Gene hin, die für Membran-, Adhäsions- und apoptose-assoziierte Proteine codieren. Membran- und Adhäsionsproteine sind für die gerichtete Lokalisation von Stamm- und Progenitorzellen innerhalb des Knochenmarks von großer Bedeutung. Dort bewirken diese Faktoren, dass HSZ in der endostealen Nische vorliegen, die Signale aussendet, um das undifferenzierte Stadium der HSZ aufrechtzuerhalten, dass Progenitorzellen hingegen in der vaskuläre Nische lokalisiert werden. Diese Nische stellt ein Milieu da, in dem die Proliferation und Differenzierung durch unterschiedliche exogene Stimuli ermöglicht wird (Schofield, 1978).

Interessanterweise zeigten Runx1^{Δ/Δ} GMPs eine deutlich erhöhte Expression solcher Gene, deren Proteine für die Interaktionen von HSZ mit der endostealen Nische wichtig sind (Mpl, Itga9, Tek), sodass anzunehmen ist, dass Runx1 als Repressor dieser Gene agiert. Mpl kodiert für den Thrombopoetinrezeptor, dessen Aktivierung durch den Liganden Thpo für den Erhalt der Quieszenz von HSZ essentiell ist (Yoshihara, et al., 2007). Itga9 kodiert für ein α -Integrin, Tek für eine Rezeptortyrosinkinase, die beide die Interaktion von HSZ mit der endostealen Nische ermöglichen (Coulombel, et al., 1997; Ikushima, et al., 2013). Eine erhöhte Expression dieser HSZ-typischen Oberflächenmoleküle auf Runx1-defiziente Progenitoren könnte zur Folge haben, dass diese nicht in der differenzierungsfördernden, vaskulären Nische, sondern in der endostealen Nische des Knochenmarks lokalisiert sind. Dort könnte sie Faktoren ausgesetzt sein, die den Selbsterhalt der Zellen vorantreiben. Faktoren hingegen, die die normale Differenzierung der Progenitoren induzieren könnten möglicherwiese nur in der Progenitornische vorhanden sein. Zwar ist nur sehr wenig über die Nische dieser Vorläufer im Knochenmark bekannt, eine Funktion von Runx1 in zellulären Adhäsionsprozessen konnte jedoch bereits gezeigt werden. In 3T3-Fibroblasten führt die retroviral-induzierte Überexpression von Runx-Faktoren zur Deregulation von Genen die für Zelloberflächenproteine und extrazelluläre Liganden kodierten. Auch Veränderungen des Adhäsions- und Zellinteraktionsverhaltens der Zellen konnte durch die Überexpression von Runx1 beobachtet werden (Wotton, *et al.*, 2008). Möglicherweise stellt diese veränderte Expression der Membranproteine auch eine Erklärung für die *in vitro* und *in vivo* beobachtete, verminderte Ausreifung *Runx1*^{Δ/Δ} myeloischer Zellen dar.

Weiterhin deuteten die Genexpressionanalysen der vorliegenden Arbeit auf eine Funktion von Runx1 bei der Regulation der Apoptose hin. Die drei Faktoren *Adamtsl4*, *Apoe* und *Apbb2* werden durch die Inaktivierung von Runx1 verstärkt exprimiert. Zwar wurde die Funktion dieser Gene in hämatopoetischen Zellen noch nicht analysiert, in anderen Geweben konnten diese Faktoren jedoch bereits mit proapoptotischen Prozessen assoziiert werden (Cao, *et al.*, 1996; Liu, *et al.*, 2006a; Dudekula, *et al.*, 2010; Hossain, *et al.*, 2013; Mao, *et al.*, 2013).

Auch Genexpressionsstudien in humanen t(8;12)-positiven Kasumizellen und murinen HSZ deuten auf eine Regulation apoptose-assoziierter Gene durch Runx1 hin (Cai, *et al.*, 2011; Ben-Ami, *et al.*, 2013). In HSZ konnte weiterhin die Regulation von Zellzyklusfaktoren durch Runx1 nachgewiesen werden (Cai, *et al.*, 2011), die in den Analysen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnten. In differenzierteren Zellen wiederum, reguliert Runx1 sehr zelltypspezifische Gene, die entweder für die Funktion oder die terminale Differenzierung dieser Zellen wichtig sind. Hierzu gehören z.B. die für die Myeloperoxidase, die neutrophile Elastase oder den M-CSF Rezeptor codierenden Gene (Nuchprayoon, *et al.*, 1994; Zhang, *et al.*, 1994).

Zusammengefasst spiegeln diese Resultate wieder, dass Runx1 in unterschiedlichen Differenzierungsstadien Gene sehr unterschiedlicher, funktionaler Netzwerke reguliert, wodurch die vielfältige Funktion von Runx1 in der Hämatopoese untermauert wird. Allerdings muss betont werden, dass in den meisten vorherigen Studien lediglich Genexpressionsmuster in An- oder Abwesenheit von Runx1 analysiert wurde. Somit war es bislang häufig nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich bei den charakterisierten potentiellen Zielgenen um direkt von Runx1-regulierte Gene handelt, oder ob Regulationen dieser Gene sekundäre Effekte darstellten. Die vorliegende Arbeit hingegen kombiniert Genexpressionsanalysen Runx1defizienten und zur Überexpression von RUNX1 manipulierter, primärer myeloischer Progenitoren und ermöglicht es so, direkte Runx1-Zielgene einzugrenzen. Zudem konnte die direkte Regulation durch Runx1 vieler der so identifizierten Gene mittels DNA-Bindungsanalysen weiter bestätigt werden. Mehr als 60% aller potentiellen Runx1-Zielgene wiesen innerhalb eines Bereiches von <100 kb von dem Transkriptionsstartpunkt entfernt eine Runx1-Bindung auf. Umgekehrt induzierte die Inaktivierung von Runx1 nicht an allen Runx1-Bindungsstellen auch eine veränderte Genexpression. Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass viele Transkriptionsfaktorbindungen für die Genexpression unerheblich sind und eher als "Lagerstätten" fungieren. Bestätigend ist bekannt, dass die Veränderung der Konzentration eines

Transkriptionsfaktors lediglich bei 1-10% seiner potentiellen Zielgene eine veränderte Expression bewirkt (zusammengefasst in: Farnham, 2009).

6.2.2 Runx1 reguliert die Zielgenexpression zusammen mit weiteren Faktoren durch die Bindung an *Enhancer*-Elemente

Mittels der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten genomweiten DNA-Bindungsanalysen konnten an 5339 DNA-Abschnitte Runx1-Bindungen identifiziert werden. Die Mehrheit dieser Bindungen erfolgte an putativen *Enhancer*-Elementen. Nur wenige Bindungen erfolgten an Promotorelementen.

Eine solche bevorzugte Interaktion von Runx1 mit *Enhancer*-Elementen kann durch Bindungsanalysen in multipotenten Vorläuferzellen (Wilson, *et al.*, 2010), B-Zellen (Niebuhr, *et al.*, 2013), Megakaryozyten (Pencovich, *et al.*, 2013) und hämogenen Endothelzellen (Lichtinger, *et al.*, 2013) bestätigt werden und scheint somit eine, in unterschiedlichen hämatopoetischen Linien, konservierte Eigenschaft von Runx1 zu sein. Interessanterweise deuten die Ergebnisse einer Studie, in der die DNA-Bindungsstellen von Pu.1 in unterschiedlichen Zelllinien analysiert wurden darauf hin, dass Bindungen an *Enhancer*-Elementen, im Gegensatz zu Promotorbindungen, sehr zelltypspezifisch erfolgen und somit für die Regulation zelltypspezifischer Gene von größerer Bedeutung sind (Heinz, *et al.*, 2010). Auch Studien zur Redundanz verschiedener Faktoren der ETS-Familie bestätigen redundante Bindungen an Promotoren und spezifische Bindungen einzelner ETS-Faktoren an *Enhancer* (Hollenhorst, *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis darauf liefern, dass eine zentrale Funktion von Runx1 darin besteht Zelltyp- und Differenzierungsspezifische Gene zu regulieren.

In einem nächsten Schritt wurden Runx1-gebundene DNA-Abschnitte auf Bindungsmotive hin untersucht. Diese Analyse deckte zum einen potentielle Bindungspartner von Runx1 auf, bestätigte zum anderen aber auch, dass Runx1-Bindungsmotive innerhalb aller Runx1gebundenen Regionen auftraten. Hieraus muss der Schluss gezogen werden, dass an nahezu allen der hier identifizierten Runx1-Bindungsstellen eine direkte Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der DNA stattfindet. In anderen Studien hingegen konnte eine solch starke Korrelation zwischen Runx1-Bindungen und Bindungsmotifen nicht nachgewiesen werden (Wilson, *et al.*, 2010; Lichtinger, *et al.*, 2013). Analysen multipotenter Vorläuferzellen zeigten, dass Runx1 häufig mit Gata2, Erg und Scl interagiert und von diesen Faktoren über Hucke-Pack-Bindungen an die DNA rekrutiert wird. Dennoch stellt Runx1 hierbei einen wichtigen Gerüstfaktor dar, der die Bindung der anderen Faktoren an die DNA stabilisiert (Wilson, *et al.*, 2010). Dass solche indirekten Bindungen in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden
konnten, ist vermutlich durch die stringent gewählten Kriterien zu erklären. Um Runx1-Bindungsstellen zu identifizieren wurden die Ergebnisse zweier ChIP-Seq-Studien verglichen und nur Bindungen, die in beiden Analysen nachgewiesen werden konnten wurden als Bindungsstellen definiert. Dieses waren vermutlich nur starke Bindungen über direkte Runx1-DNA-Interaktionen. Dass dennoch auch schwache, eventuell indirekte Bindungen zwischen Runx1 und der DNA bestehen, darauf deutet die Untersuchungen endogener Runx1-Bindungsstellen hin, anhand derer 25.000 Bindungsstellen ermittelt werden konnten.

Weiterhin konnte durch die *de novo*-Motivanalysen Runx1-gebundener DNA-Abschnitte Ets-, Gata-, Cebp- und Stat-Faktoren als potentielle Bindungspartner von Runx1 identifiziert werden. Dass Runx1 ein relativ schwacher Aktivator der Transkription ist und in der Regel eine gemeinsame Bindung mit anderen Faktoren notwendig ist, um die Promotoraktivität der Zielgene zu regulieren konnte bereits vielfach gezeigt werden (zusammengefasst in: Perry, *et al.*, 2002). Kooperationen von Gata2 und Runx1 konnte bereits in HSZ nachgewiesen werden. Hier wirkt Runx1 offenbar häufig mit sechs anderen Faktoren zusammen, darunter Gata2, um die Expression wichtiger Zielgene zu regulieren und so Genprogramme anzuschalten, die den Selbsterhalt der Zellen bewirken. Interessanterweise wiesen rund 50% der, in myeloischen Progenitoren von Runx1-gebundenen Genloci, bereits in HSZ eine Runx1-Bindung auf (Wilson, *et al.*, 2010). Dieses Ergebnis unterstützt das stochastische Modell der Hämatopoese, dass davon ausgeht, dass *Enhancer* linienspezifsicher Gene in multipotenten Zellen bereits auf ihre spätere Aktivierung vorbereitet werden und diese spezifischen Gene ggf. bereits auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden (Hu, *et al.*, 1997; Mercer, *et al.*, 2011).

Co-Bindungen von Runx1 mit Cebp und dem Ets-Faktor, Pu.1, konnten zuvor bereits an Genloci nachgewiesen werden, deren Expression für die myeloischen Reifung essentiell sind, wie dem Gen des M-CSF-Rezeptors (Zhang, *et al.*, 1994; Zhang, *et al.*, 1996). In diesem Fall trägt Runx1 somit zu Regulation von Differenzierungsprozessen bei. Gemeinsame DNA-Bindungen von Runx1 und Stat-Faktoren konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben werden. Möglicherweise liefert dieses Ergebnis jedoch einen wichtigen Hinweis darauf wie extrinsische Stimuli instruktiv die hämatopoetische Entwicklung beeinflussen können. Stat-Faktoren werden durch Zytokin-induzierte Signalwege aktiviert. Das Auftreten gemeinsamer Bindungsmotive von Runx1 und Stat-Faktoren deutet darauf hin, dass diese induzierbaren Faktoren möglicherweise mit Runx1 kooperieren oder gar als Pionierfaktoren agieren und Runx1 so an Genloci rekrutieren, deren Expression für eine geordnete Differenzierung notwendig ist. Sodass diese Ergebnisse zusammengefasst die Hypothese eines Hybridmodels der Hämatopoese unterstützen.

Welche Funktion hat Runx1 aber während der myeloischen Entwicklung? Das Runx1 für die Etablierung der definitiven Hämatopoese unentbehrlich ist konnte bereits nachgewiesen werden (Okuda, et al., 1996; Wang, et al., 1996; Chen, et al., 2009). Dort induziert Runx1, ähnlich einem Pionierfaktor, die Relokalisation weiterer Transkriptionsfaktoren (Lichtinger, et al., 2013). Dass Runx1 auch während der myeloischen Entwicklung eine wichtige, wenn auch nicht so zentrale Funktion, wie während der Embryonalentwicklung besitzt, darauf weisen konditionale Runx1-Knockout Mausmodelle hin. Dort führt der Verlust von Runx1 zu einer deutlichen Expansion des HSZ- und myeloischen Progenitorkompartiments (Ichikawa, et al., 2004; Growney, et al., 2005; Putz, et al., 2006; Ichikawa, et al., 2008). In Anbetracht der hier erzielten Ergebnisse und der Daten bereits publizierter Studien scheint Runx1 während der adulten Hämatopoese Gene sehr unterschiedlicher regulatorischer Netzwerke zu regulieren (Selbsterhalt, Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung), die jedoch alle miteinander gekoppelt sind um eine normale hämatopoetische Entwicklung zu gewährleisten. Runx1 scheint hierbei für keinen der Prozesse essentiell zu sein, sondern eher die Fein-Regulation zu übernehmen, um die adäquate Differenzierung hämatopoetischer Zellen zu gewährleisten. Auch die Gewichtigkeit von Runx1 an unterschiedlichen Genloci scheint zu divergieren. So bewirkt die Inaktivierung von Runx1 nicht an allen, normalerweise von Runx1-gebundenen Genloci, auch eine veränderte Genexpression. An manchen Enhancer-Elementen scheint Runx1 ein wichtiger Faktor zu sein um die Genexpression zu regulieren, an anderen Enhancern hingegen fungiert Runx1 wohlmöglich als Gerüstfaktor, der Komplexe anderer Transkriptionsfaktoren zusammenhält.

6.3 Die onkogene Funktion von Runx1

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Inaktivierung von Runx1 auf die Leukämogenese hat. Die Annahme, dass ein Funktionsverlust von Runx1 ein wichtiger Faktor bei der Transformation hämatopoetischer Zellen ist, leitet sich vor allem aus dem häufigen Auftreten von *RUNX1*-Punktmutationen in AMLs des M0-Subtypes ab (Preudhomme, *et al.*, 2009; Schnittger, *et al.*, 2011). Zudem wird die Hypothese durch die im ersten Teil dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt, die auf eine tumorsupprimierende Funktion von Runx1 hinweisen. Da *RUNX1*-Punktmutation in humanen Leukämien häufig in Kombination mit aktivierenden Mutationen der FLT3-Rezeptortyrosinkinase assoziiert sind (Tang, *et al.*, 2009; Schnittger, *et al.*, 2011) wurden dieses Modell gewählt, um die Funktion von Runx1 während der leukämischen Transformation zu analysieren.

Die Expression von FLT3-ITD in Runx1-deletierten Zellen führte zwar in einigen Mäusen zu einer myeloproliferativen Neoplasie, war jedoch nicht ausreichend um eine Leukämie zu

induzieren. Identische Resultate lieferten Experimente, in denen zusätzlich eine DNA-Bindungsmutante von RUNX1-überexprimiert wurde. Die Wiedereinführung vom wt-RUNX1 führte jedoch, entgegen den Erwartungen, zu einer aggressiven myeloische Leukämie der Empfängertiere. Ebenso wie in humanen AML-M0-Patienten wiesen auch die murinen Myeloblasten keinerlei Differenzierungsanzeichen auf. Diese Resultate liefern den Beweis, dass für die Entstehung einer Leukämie eine gewisse Runx1-Aktivität notwendig ist und dass die DNA-Bindung von Runx1 hierfür essenziell ist.

Diese onkogene Wirkung erscheint widersprüchlich zu den Ergebnissen des ersten Teils dieser Arbeit und zahlreichen publizierten Daten in denen eine tumorsupprimierende Funktion von Runx1 bestätigt werden konnte. Dennoch gibt es mehrere Beweise dafür, dass Runx-Faktoren auch ein onkogenes Potential besitzen. Das erste Indiz hierauf lieferten Studien in CD2-MYC-Mäusen. In retroviral induzierten T-Zelllymphomen dieser Mäuse stellt der Runx2-Locus ein sehr häufiges Ziel für die provirale Insertion dar. Dieses bewirkt eine erhöhte Runx2-Expression (Stewart, et al., 1997). Anhand von ähnlichen Untersuchungen konnten in den Folgejahren auch Insertionen in den Runx1-Locus, und hiermit verbundene erhöhte Runx1-Expressionsniveaus nachgewiesen werden, vor allem in T- und B-Zelllymphomen aber auch in einer megakaryoblastischen Leukämie (Li, et al., 1999; Mikkers, et al., 2002; Wotton, et al., 2002; Yanagida, et al., 2005). Der Beweis, dass die Expression des kompletten Proteins und nicht einer verkürzten, potentiell dominant negativ wirkenden Isoform diese Lymphome bedingt, konnte ebenfalls bereits erbracht werden (Vaillant, et al., 1999). Die Beobachtungen, dass bei 44% aller ALL-Patienten eine erhöhte RUNX1-Expression vorliegt (Mikhail, et al., 2002) und in einigen pädiatrischen B-Zell-ALLs Amplifikation des RUNX1-Locus vorliegen untermauern die Bedeutsamkeit einer verstärkten RUNX1-Expression in lymphatischen Leukämien (Niini, et al., 2000; Harewood, et al., 2003). Im Gegensatz hierzu treten Amplifikation des Runx1-Locus in myeloischen Leukämien zwar nur selten auf (Roumier, et al., 2003), dennoch ist auffällig dass RUNX1-Mutationen in AML-Patienten selten zu einem völligen Funktionsverlust des Proteins führen. Neue Untersuchungen des RUNX1-Status großer AML-Patientengruppen belegen, dass diese Mutationen meistens monoallelisch auftreten. Biallelische Mutationen treten vermutlich nicht so häufig auf, wie anfangs angenommen (Preudhomme, et al., 2000; Schnittger, et al., 2011) und sind in der Regel heterozygot. Hierbei wird nur ein Allel durch Deletionen oder Verschiebungen des Leserahmens völlig inaktiviert, während auf dem anderen Allel eine missense-Mutation vorliegt, häufig innerhalb der DNA-Bindungsdomäne, sodass Proteine mit verminderter DNA-Bindungskapazität entstehen (Tang, et al., 2009; Network, 2013). Auch in Leukämien mit chromosomalen Aberrationen, wie t(8;21) oder inv(16), konnten keine Mutationen des zweiten RUNX1-Allels nachgewiesen werden (Tang, et al., 2009; Schnittger, et al., 2011;

zusammengefasst in: Goyama and Mulloy, 2011). Einen Beleg dafür, dass die Funktion von Runx2 für die inv(16)-induzierte Leukämogenese förderlich ist konnte dadurch erbracht werden, dass die heterozygote Inaktivierung von Runx2 im inv(16)-Mausleukämiemodell zu einer verminderten Penetranz und zu einer zeitlichen Verzögerung der Leukämieentwicklung führt (Kuo, *et al.*, 2009). All diese Daten deuten, ebenso wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Runx1 neben der tumorsupprimierenden, auch eine onkogene Funktion besitzt und dass weiterhin eine gewisse Runx1-Aktivität nötig ist, um eine Leukämie zu induzieren.

Doch wie unterstützt Runx1 die Leukämogenese? Einen möglichen Hinweis hierauf liefern die, im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführten Genexpressionsanalysen Runx1überexprimierender und -deletierter myeloischer Progenitoren. Innerhalb der Gruppe reziprok regulierter Gene dominierten zwar, wie bereits beschrieben, Membran- und Adhäsionsfaktoren, allerdings zeigte auch eine kleine Gruppe von Genen, die mit proapoptotischen Prozessen in Verbindung stehen eine stark verminderte Expression in RUNX1-überexprimierenden Zellen. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien bestätigen zudem, dass Runx1 für das Überleben und das Wachstum leukämischer Zellen notwendig ist (Ben-Ami, *et al.*, 2013; Goyama, *et al.*, 2013). Sowohl im t(8;21)-positiven Kasumizellmodell als auch in AML-ETO überexprimierenden, humanen Vorläuferzellen führt der shRNA-induzierte *knock-down* von Runx1 zur Apoptose. Runx1 könnte somit in dem hier analysierten Mausleukämiemodell den präleukämischen Blasten den entscheidenden Überlebensvorteil vermitteln, um eine Leukämie zu induzieren.

Eine weitere mögliche Erklärung ergibt sich aus den hier durchgeführten Runx1-DNA-Bindungsanalysen. Diese deuteten auf eine potentielle gemeinsame DNA-Bindung von Runx1 und Stat-Faktoren hin. Da Stat-Faktoren durch Rezeptortyrosinkinasen wie FLT3 aktiviert werden, könnte die konstitutive Aktivität des FLT3-Rezeptors zu einer erhöhten Stat-Aktivität führen und diese Faktoren gemeinsam mit Runx1 die Regulation anderer, die Transformation begünstigender, Gene aktivieren.

6.4 Die duale Funktion von Runx1

In wie fern passen die hier erzielten Resultate in das von Dash und Gilliland (2001) postulierte *Two- hit-Model*? Das Modell geht davon aus, das für die leukämische Transformation mindestens zwei Mutationen notwendig sind. Eine Mutation induziert hierbei den Proliferationsbzw. Überlebensvorteil der Zellen, die andere Mutation inhibiert die Differenzierung (Dash and Gilliland, 2001). In den, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimenten, induzierte die Expression von FLT3-ITD zusammen mit einer Überexpression von RUNX1 in Runx1-deletierten Knochenmarkzellen eine Leukämie. Die Deletion von Runx1 zusammen mit einer Überexpression von FLT3-ITD war jedoch nicht ausreichend um eine Leukämie zu induzieren und bewirkt einen myeloproliferativen Phänotyp.

Die Inaktivierung von Runx1 führt, wie in der hier durchgeführten Arbeit gezeigt, zu einer verzögerten Differenzierung früher Zellen, sodass die unreifen Zellen akkumulieren, länger im Knochenmark verbleiben und weitere Mutationen ansammeln können. Diese verzögerte Differenzierung könnte als schwache Klasse II-Mutation gewertet werden. FLT3-ITD zählt gemäß der Klassifizierung von Dash und Gilliland zu den Mutationen der Klasse I, die durch die konstitutive Aktivierung nachgeschalteter Signalwege die Proliferation von Zellen stimuliert (Fenski, *et al.*, 2000). Allerdings zeigen Analysen in myeloischen Vorläuferzelllinien, dass FLT3-ITD zusätzlich als schwache Klasse II-Mutation fungiert. Die Überexpression von RUNX1 könnte entweder durch anti-apoptotische Effekte (Klasse II) die Transformation bedingen oder durch die Kooperation mit Stat-Faktoren neue Zielgene aktiviert werden, die die Transformation der Zelle bewirken.

Interessanterweise induziert auch die heterozygote Deletion von *Runx1* im Mausmodell eine Myeloproliferation (Sun and Downing, 2004), sodass Runx1 in diesem Fall als haploinsuffizienter Tumorsuppressor fungiert. Dieses könnte eine Erklärung dafür bieten, dass in AML-Patienten häufig nur eine *RUNX1*-Allel mutiert ist (Tang, *et al.*, 2009; Schnittger, *et al.*, 2011).



Abb. 25: Modell zur AML-Entstehung. Die Inaktivierung von Runx1 bewirkt eine defektive Differenzierung. Die FLT3-ITD-Mutation inhibiert die Differenzierung ebenfalls, fördert jedoch zusätzlich die Proliferation der Zelle. Zusammen induzieren diese beiden Mutationen eine myeloproliferative Neoplasie. Die zusätzliche Überexpression von RUNX1 verschafft den Zellen einen zusätzlichen Vorteil, entweder durch seine anti-apoptotische Funktion, oder durch die Regulation neuer Zielgene in Kooperation mit Stat-Faktoren. Dieses induziert die AML. Gestrichelte Linien repräsentieren milde Effekte, durchgezogene Linien starke Effekte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei wichtige Ergebnisse bezüglich der Funktion von Runx1 in myelosichen Progenitoren erarbeitet werden. Einerseits hat Runx1 eine tumorsuppressive Funktion, in dem es eine adäquate Differenzierung und Proliferation früher Zellen sicherstellt, andererseits agiert RUNX1 während der Leukämogenese also Onkogen. Somit konnte durch die Ergebnisse dieser Studie die Hypothese bestätigt werden, dass sowohl der Funktionsverlust von Runx1, als auch ein Funktionsgewinn von Runx1 zur Leukämieentstehung beiträgt.

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR and Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia, *Br J Haematol*, 2001; 113 (4): 983-8.
- Adya N, Stacy T, Speck NA and Liu PP. The leukemic protein core binding factor beta (CBFbeta)-smoothmuscle myosin heavy chain sequesters CBFalpha2 into cytoskeletal filaments and aggregates, *Mol Cell Biol*, 1998; 18 (12): 7432-43.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T and Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages, *Nature*, 2000; 404 (6774): 193-7.
- Alberich-Jorda M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, Radomska HS, Ebralidze AK, Amabile G, Ye M, Zhang J, Lowers I, Avellino R, Melnick A, Figueroa ME, Valk PJ, Delwel R and Tenen DG. C/EBPgamma deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia, *J Clin Invest*, 2012; 122 (12): 4490-504.
- Antonson P, Stellan B, Yamanaka R and Xanthopoulos KG. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus, *Genomics*, 1996; 35 (1): 30-8.
- Aronson BD, Fisher AL, Blechman K, Caudy M and Gergen JP. Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins, *Mol Cell Biol*, 1997; 17 (9): 5581-7.
- Ashley DJ. The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis, Br J Cancer, 1969; 23 (2): 313-28.
- Aziz-Aloya RB, Levanon D, Karn H, Kidron D, Goldenberg D, Lotem J, Polak-Chaklon S and Groner Y. Expression of AML1-d, a short human AML1 isoform, in embryonic stem cells suppresses in vivo tumor growth and differentiation, *Cell Death Differ*, 1998; 5 (9): 765-73.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW and Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching, *Nucleic Acids Res*, 2009; 37 (Web Server issue): W202-8.
- Banerji J, Rusconi S and Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences, *Cell*, 1981; 27 (2 Pt 1): 299-308.
- Ben-Ami O, Friedman D, Leshkowitz D, Goldenberg D, Orlovsky K, Pencovich N, Lotem J, Tanay A and Groner Y. Addiction of t(8;21) and inv(16) Acute Myeloid Leukemia to Native RUNX1, *Cell Rep*, 2013; 4 (6): 1131-43.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group, *Br J Haematol*, 1976; 33 (4): 451-8.
- Beyer WR, Westphal M, Ostertag W and von Laer D. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range, *J Virol*, 2002; 76 (3): 1488-95.
- Blyth K, Cameron ER and Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer, *Nat Rev Cancer*, 2005; 5 (5): 376-87.
- Bradford GB, Williams B, Rossi R and Bertoncello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment, *Exp Hematol*, 1997; 25 (5): 445-53.

- Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J, Buerger H, Muller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE and Serve H. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation, *Cancer Res*, 2005; 65 (21): 9643-50.
- Brunning RD, Matutes E and Harris NL: Acute myloid leukemia: introduction. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds.: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.(IARC Press: 2001)
- Cai X, Gaudet JJ, Mangan JK, Chen MJ, De Obaldia ME, Oo Z, Ernst P and Speck NA. Runx1 loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells, *PLoS One*, 2011; 6 (12): e28430.
- Calkhoven CF, Muller C and Leutz A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression, *Genes Dev*, 2000; 14 (15): 1920-32.
- Cammenga J, Niebuhr B, Horn S, Bergholz U, Putz G, Buchholz F, Lohler J and Stocking C. RUNX1 DNA-binding mutants, associated with minimally differentiated acute myelogenous leukemia, disrupt myeloid differentiation, *Cancer Res*, 2007; 67 (2): 537-45.

Campbell NA and Reece JB. Biologie. (Spektrum, Akademischer Verlag: 2003).

- Cao H, Mattison J, Zhao Y, Joki N, Grasso M and Chang NS. Regulation of tumor necrosis factor-and Fas-mediated apoptotic cell death by a novel cDNA TR2L, *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; 227 (1): 266-72.
- Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR and Gilliland DG. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93 (25): 14845-50.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E and Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter, *Nature*, 2009; 457 (7231): 887-91.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X and Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of longterm self-renewing hematopoietic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96 (6): 3120-5.
- Coulombel L, Auffray I, Gaugler MH and Rosemblatt M. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells, *Acta Haematol*, 1997; 97 (1-2): 13-21.
- Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML and Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors, *Genes Dev*, 2003; 17 (24): 3029-35.
- Dahmus ME. The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1994; 48 143-79.
- Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L and Nutt SL. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis, *J Exp Med*, 2005; 201 (9): 1487-502.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liau LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG and Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*, 2009; 462 (7274): 739-44.
- Dash A and Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia, *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001; 14 (1): 49-64.

- DeKoter RP and Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1, *Science*, 2000; 288 (5470): 1439-41.
- Descombes P and Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA, *Cell*, 1991; 67 (3): 569-79.
- Dudekula S, Lee MH, Hsu LJ, Chen SJ and Chang NS. Zfra is a small wizard in the mitochondrial apoptosis, *Aging (Albany NY)*, 2010; 2 (12): 1023-9.
- Duprez E, Wagner K, Koch H and Tenen DG. C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells, *EMBO J*, 2003; 22 (21): 5806-16.
- Durst KL, Lutterbach B, Kummalue T, Friedman AD and Hiebert SW. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain, *Mol Cell Biol*, 2003; 23 (2): 607-19.
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL and Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation, *Blood*, 2003; 101 (11): 4333-41.
- Farnham PJ. Insights from genomic profiling of transcription factors, Nat Rev Genet, 2009; 10 (9): 605-16.
- Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE and Serve H. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells, *Br J Haematol*, 2000; 108 (2): 322-30.
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A and Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells, *Science*, 2006; 311 (5757): 83-7.
- Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF and Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93 (20): 10838-43.
- Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG and Lazar MA. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO, *Mol Cell Biol*, 1998; 18 (12): 7185-91.
- Gilliland DG and Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia, *Blood*, 2002; 100 (5): 1532-42.
- Gilliland DG and Tallman MS. Focus on acute leukemias, Cancer Cell, 2002; 1 (5): 417-20.
- Gilliland DG, Jordan CT and Felix CA. The molecular basis of leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2004; 80-97.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M and Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation, *Cell*, 1994; 77 (2): 307-16.
- Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, Takeuchi S, Krug U, Kwok SH, Larsen RJ, Asou H, Miller CW, Hoelzer D and Koeffler HP. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias, *Blood*, 2002; 99 (4): 1332-40.
- Goyama S and Mulloy JC. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects, *Int J Hematol*, 2011; 94 (2): 126-33.

- Goyama S, Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, Nakagawa M, Olsson A, Wunderlich M, Link KA, Mizukawa B, Grimes HL, Kurokawa M, Liu PP, Huang G and Mulloy JC. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells, *J Clin Invest*, 2013; 123 (9): 3876-88.
- Graf T and Beug H. Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation, *Cell*, 1983; 34 (1): 7-9.
- Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J and Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain, *Mol Cell*, 2004; 13 (2): 169-78.
- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG and Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences, *Blood*, 1997; 89 (2): 376-87.
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA and Gilliland DG. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype, *Blood*, 2005; 106 (2): 494-504.
- Guo H and Friedman AD. Phosphorylation of RUNX1 by cyclin-dependent kinase reduces direct interaction with HDAC1 and HDAC3, *J Biol Chem*, 2011; 286 (1): 208-15.
- Guo H, Ma O, Speck NA and Friedman AD. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis, *Blood*, 2013; 119 (19): 4408-18.
- Haberland M, Montgomery RL and Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nat Rev Genet*, 2009; 10 (1): 32-42.
- Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Sumption N, Richards S, Mitchell C and Harrison CJ. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases, *Leukemia*, 2003; 17 (3): 547-53.
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H and Naoe T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3dependent cell lines, *Oncogene*, 2000; 19 (5): 624-31.
- Hegde SP, Zhao J, Ashmun RA and Shapiro LH. c-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors, *Blood*, 1999; 94 (5): 1578-89.
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H and Glass CK. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities, *Mol Cell*, 2010; 38 (4): 576-89.
- Heng TS and Painter MW. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells, *Nat Immunol*, 2008; 9 (10): 1091-4.
- Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K and Tenen DG. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis, *Nat Immunol*, 2006; 7 (7): 732-9.
- Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE and Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene, *Mol Cell Biol*, 1995; 15 (10): 5830-45.
- Hollenhorst PC, Shah AA, Hopkins C and Graves BJ. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family, *Genes Dev*, 2007; 21 (15): 1882-94.

- Holtschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F, Lou J, Knobeloch KP, Gabriele L, Waring JF, Bachmann MF, Zinkernagel RM, Morse HC, 3rd, Ozato K and Horak I. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene, *Cell*, 1996; 87 (2): 307-17.
- Hossain GS, Lynn EG, Maclean KN, Zhou J, Dickhout JG, Lhotak S, Trigatti B, Capone J, Rho J, Tang D, McCulloch CA, Al-Bondokji I, Malloy MJ, Pullinger CR, Kane JP, Li Y, Shiffman D and Austin RC. Deficiency of TDAG51 protects against atherosclerosis by modulating apoptosis, cholesterol efflux, and peroxiredoxin-1 expression, *J Am Heart Assoc*, 2013; 2 (3): e000134.
- Hou HA, Chou WC, Lin LI, Chen CY, Tang JL, Tseng MH, Huang CF, Chiou RJ, Lee FY, Liu MC and Tien HF. Characterization of acute myeloid leukemia with PTPN11 mutation: the mutation is closely associated with NPM1 mutation but inversely related to FLT3/ITD, *Leukemia*, 2008; 22 (5): 1075-8.
- Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C and Enver T. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system, *Genes Dev*, 1997; 11 (6): 774-85.
- Hu Z, Gu X, Baraoidan K, Ibanez V, Sharma A, Kadkol S, Munker R, Ackerman S, Nucifora G and Saunthararajah Y. RUNX1 regulates corepressor interactions of PU.1, *Blood*, 2011; 117 (24): 6498-508.
- Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat Protoc*, 2009a; 4 (1): 44-57.
- Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res*, 2009b; 37 (1): 1-13.
- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD and Tenen DG. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis, *Nat Genet*, 2008; 40 (1): 51-60.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M and Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis, *Nat Med*, 2004; 10 (3): 299-304.
- Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S and Kurokawa M. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis, J Immunol, 2008; 180 (7): 4402-8.
- Ikushima YM, Arai F, Nakamura Y, Hosokawa K, Kubota Y, Hirashima M, Toyama H and Suda T. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2013; 430 (1): 20-5.
- Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K and Hirai H. Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis, *Blood*, 2000; 96 (9): 3154-60.
- Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF, *Genes Cells*, 1999; 4 (12): 685-96.
- Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview', Oncogene, 2004; 23 (24): 4198-208.
- Iwasaki H and Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell, *Immunity*, 2007; 26 (6): 726-40.

- Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR, Asou N and Ito Y. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis, *Blood*, 2010; 115 (8): 1610-20.
- Jones LC, Lin ML, Chen SS, Krug U, Hofmann WK, Lee S, Lee YH and Koeffler HP. Expression of C/EBPbeta from the C/ebpalpha gene locus is sufficient for normal hematopoiesis in vivo, *Blood*, 2002; 99 (6): 2032-6.
- Just U, Stocking C, Spooncer E, Dexter TM and Ostertag W. Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation, *Cell*, 1991; 64 (6): 1163-73.
- Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y and Shigesada K. Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer, *J Virol*, 1990; 64 (10): 4808-19.
- Karasuyama H and Melchers F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors, *Eur J Immunol*, 1988; 18 (1): 97-104.
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K and Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemiaassociated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation, *EMBO J*, 1998; 17 (11): 2994-3004.
- Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A and Ohki M. Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein, *EMBO J*, 2001; 20 (24): 7184-96.
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H and Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product, *Leukemia*, 1998; 12 (9): 1333-7.
- Komori T and Kishimoto T. Cbfa1 in bone development, Curr Opin Genet Dev, 1998; 8 (4): 494-9.
- Krivega I and Dean A. Enhancer and promoter interactions-long distance calls, *Curr Opin Genet Dev*, 2011; 22 (2): 79-85.
- Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, Kohlmann A, Hiddemann W, Haferlach T and Schnittger S. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia, *Haematologica*, 2005; 90 (12): 1617-25.
- Kuo YH, Zaidi SK, Gornostaeva S, Komori T, Stein GS and Castilla LH. Runx2 induces acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfbeta-SMMHC in mice, *Blood*, 2009; 113 (14): 3323-32.
- Laiosa CV, Stadtfeld M and Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification, *Annu Rev Immunol*, 2006; 24 705-38.
- Lamandin C, Sagot C, Roumier C, Lepelley P, De Botton S, Cosson A, Fenaux P and Preudhomme C. Are PU.1 mutations frequent genetic events in acute myeloid leukemia (AML)?, *Blood*, 2002; 100 (13): 4680-1.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M and Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biol*, 2009; 10 (3): R25.
- Langmead B and Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat Methods*, 2012; 9 (4): 357-9.

- Leffell MS and Spitznagel JK. Intracellular and extracellular degranulation of human polymorphonuclear azurophil and specific granules induced by immune complexes, *Infect Immun*, 1974; 10 (6): 1241-9.
- Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P and Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies, *Leukemia*, 2005; 19 (3): 329-34.
- Levanon D, Glusman G, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, Bangsow C, Hattori M, Taylor TD, Taudien S, Blechschmidt K, Shimizu N, Rosenthal A, Sakaki Y, Lancet D and Groner Y. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1, *Gene*, 2001; 262 (1-2): 23-33.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER and Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia, *N Engl J Med*, 2010; 363 (25): 2424-33.
- Li J, Shen H, Himmel KL, Dupuy AJ, Largaespada DA, Nakamura T, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA and Copeland NG. Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions, *Nat Genet*, 1999; 23 (3): 348-53.
- Lichtinger M, Ingram R, Hannah R, Muller D, Clarke D, Assi SA, Lie ALM, Noailles L, Vijayabaskar MS, Wu M, Tenen DG, Westhead DR, Kouskoff V, Lacaud G, Gottgens B and Bonifer C. RUNX1 reshapes the epigenetic landscape at the onset of haematopoiesis, *EMBO J*, 2013; 31 (22): 4318-33.
- Liew E and Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature, *Haematologica*, 2011; 96 (10): 1536-42.
- Liu J, Guo Q, Chen B, Yu Y, Lu H and Li YY. Cathepsin B and its interacting proteins, bikunin and TSRC1, correlate with TNF-induced apoptosis of ovarian cancer cells OV-90, *FEBS Lett*, 2006a; 580 (1): 245-50.
- Liu Y, Cheney MD, Gaudet JJ, Chruszcz M, Lukasik SM, Sugiyama D, Lary J, Cole J, Dauter Z, Minor W, Speck NA and Bushweller JH. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity, *Cancer Cell*, 2006b; 9 (4): 249-60.
- Lorsbach RB, Moore J, Ang SO, Sun W, Lenny N and Downing JR. Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression, *Blood*, 2004; 103 (7): 2522-9.
- Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E and Hiebert SW. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors, *Mol Cell Biol*, 1998; 18 (12): 7176-84.
- Lutterbach B, Hou Y, Durst KL and Hiebert SW. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96 (22): 12822-7.
- Mao L, Zhou Q, Zhou S, Wilbur RR and Li X. Roles of apolipoprotein E (ApoE) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in inflammation and apoptosis in preeclampsia pathogenesis and progression, *PLoS One*, 2013; 8 (3): e58168.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson

JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK and Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome, *N Engl J Med*, 2009; 361 (11): 1058-66.

- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ and Maki RA. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities, *EMBO J*, 1996; 15 (20): 5647-58.
- Melnikova IN, Crute BE, Wang S and Speck NA. Sequence specificity of the core-binding factor, *J Virol*, 1993; 67 (4): 2408-11.
- Mercer EM, Lin YC, Benner C, Jhunjhunwala S, Dutkowski J, Flores M, Sigvardsson M, Ideker T, Glass CK and Murre C. Multilineage priming of enhancer repertoires precedes commitment to the B and myeloid cell lineages in hematopoietic progenitors, *Immunity*, 2011; 35 (3): 413-25.
- Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T and Thanos D. Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription, *Mol Cell*, 1998; 1 (2): 277-87.
- Meyers S, Downing JR and Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions, *Mol Cell Biol*, 1993; 13 (10): 6336-45.
- Meyers S, Lenny N and Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation, *Mol Cell Biol*, 1995; 15 (4): 1974-82.
- Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, Shigesada K, Ito Y, Benson KF, Raskind WH, Rossier C, Antonarakis SE, Israels S, McNicol A, Weiss H, Horwitz M and Scott HS. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis, *Blood*, 2002; 99 (4): 1364-72.
- Mikhail FM, Serry KA, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, Coignet L and Nucifora G. AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 2002; 16 (4): 658-68.
- Mikkers H, Allen J, Knipscheer P, Romeijn L, Hart A, Vink E and Berns A. High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer, *Nat Genet*, 2002; 32 (1): 153-9.
- Minami Y, Stuart SA, Ikawa T, Jiang Y, Banno A, Hunton IC, Young DJ, Naoe T, Murre C, Jamieson CH and Wang JY. BCR-ABL-transformed GMP as myeloid leukemic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U* S A, 2008; 105 (46): 17967-72.
- Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, Takenaka K, Mizuno S, Gondo H, Okamura T, Dohy H and Niho Y. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia, *Blood*, 1996; 87 (11): 4789-96.
- Miyamoto T, Weissman IL and Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97 (13): 7521-6.

- Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, Kamada N and Ohki M. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript, *EMBO J*, 1993; 12 (7): 2715-21.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E and Ohki M. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia, *Nucleic Acids Res*, 1995; 23 (14): 2762-9.
- Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M and Takahashi S. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages, *Mol Cell Biol*, 2006; 26 (15): 5715-27.
- Morita S, Kojima T and Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses, *Gene Ther*, 2000; 7 (12): 1063-6.
- Morrison SJ and Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype, *Immunity*, 1994; 1 (8): 661-73.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE and Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors, *Development*, 1997; 124 (10): 1929-39.
- Mueller BU, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen LM, Minden MD, Behre G, Hiddemann W, Ito Y and Tenen DG. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia, *Blood*, 2002; 100 (3): 998-1007.
- Murphy K, Travers P and Walport M. Janeway's Immunobiology. (Garland Science: 2008).
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T and Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 1996; 10 (12): 1911-8.
- Natsuka S, Akira S, Nishio Y, Hashimoto S, Sugita T, Isshiki H and Kishimoto T. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6, *Blood*, 1992; 79 (2): 460-6.
- Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias, Nat Rev Cancer, 2004; 4 (5): 394-400.
- Network TCGAR. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia, *N Engl J Med*, 2013; 368 (22): 2059-74.
- Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE and Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults, *Ther Adv Hematol*, 2013; 4 (4): 254-69.
- Niebuhr B, Kriebitzsch N, Fischer M, Behrens K, Gunther T, Alawi M, Bergholz U, Muller U, Roscher S, Ziegler M, Buchholz F, Grundhoff A and Stocking C. Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development, *Blood*, 2013; 122 (3): 413-23.
- Niini T, Kanerva J, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM and Knuutila S. AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica*, 2000; 85 (4): 362-6.
- Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S and Friedman AD. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells, *Mol Cell Biol*, 1994; 14 (8): 5558-68.

- Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B and Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter, *Mol Cell Biol*, 1996; 16 (9): 4717-25.
- Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K and Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90 (14): 6859-63.
- Ogihara H, Kanno T, Morii E, Kim DK, Lee YM, Sato M, Kim WY, Nomura S, Ito Y and Kitamura Y. Synergy of PEBP2/CBF with mi transcription factor (MITF) for transactivation of mouse mast cell protease 6 gene, *Oncogene*, 1999; 18 (32): 4632-9.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G and Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis, *Cell*, 1996; 84 (2): 321-30.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T and Imagawa M. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancerbinding protein transcription factor family, *J Biol Chem*, 1996; 271 (7): 3891-6.
- Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K and Ito Y. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias, *Blood*, 1999; 93 (6): 1817-24.
- Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia, *Oncogene*, 2004; 23 (24): 4284-96.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W and Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding proteinalpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia, *Nat Genet*, 2001; 27 (3): 263-70.
- Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT, Chih DY, Gombart AF, Miller WH, Jr. and Koeffler HP. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment, *J Clin Invest*, 1999; 103 (10): 1399-408.
- Pencovich N, Jaschek R, Dicken J, Amit A, Lotem J, Tanay A and Groner Y. Cell-autonomous function of Runx1 transcriptionally regulates mouse megakaryocytic maturation, *PLoS One*, 2013; 8 (5): e64248.
- Perry C, Eldor A and Soreq H. Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners, *Leuk Res*, 2002; 26 (3): 221-8.
- Peterson LF and Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis, *Oncogene*, 2004; 23 (24): 4255-62.
- Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG and Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1, *Mol Cell Biol*, 1998; 18 (7): 3915-25.
- Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, Grardel-Duflos N, Garand R, Lai JL, Dastugue N, Macintyre E, Denis C, Bauters F, Kerckaert JP, Cosson A and Fenaux P. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21, *Blood*, 2000; 96 (8): 2862-9.
- Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P and Dombret H. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA), *Blood*, 2002; 100 (8): 2717-23.

- Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, Dhedin N, Andre JM, Cornillet-Lefebvre P, Baruchel A, Mozziconacci MJ and Sobol H. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder, *Blood*, 2009; 113 (22): 5583-7.
- Pronk CJ, Rossi DJ, Mansson R, Attema JL, Norddahl GL, Chan CK, Sigvardsson M, Weissman IL and Bryder D. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy, *Cell Stem Cell*, 2007; 1 (4): 428-42.
- Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N and Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas, *Oncogene*, 2006; 25 (6): 929-39.
- Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT and Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors, *Mol Cell Biol*, 1998; 18 (7): 4301-14.
- Ramji DP and Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J*, 2002; 365 (Pt 3): 561-75.
- Reed-Inderbitzin E, Moreno-Miralles I, Vanden-Eynden SK, Xie J, Lutterbach B, Durst-Goodwin KL, Luce KS, Irvin BJ, Cleary ML, Brandt SJ and Hiebert SW. RUNX1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription, *Oncogene*, 2006; 25 (42): 5777-86.
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P and Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature, *Leukemia*, 2008; 22 (5): 915-31.
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S and Tenen DG. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1, *Nat Genet*, 2004; 36 (6): 624-30.
- Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U and Tenen DG. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells, *Blood*, 2005; 106 (5): 1519-24.
- Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V and Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies, *Leukemia*, 2003; 17 (1): 9-16.
- Roumier C, Lejeune-Dumoulin S, Renneville A, Goethgeluck AS, Philippe N, Fenaux P and Preudhomme C. Cooperation of activating Ras/rtk signal transduction pathway mutations and inactivating myeloid differentiation gene mutations in M0 AML: a study of 45 patients, *Leukemia*, 2006; 20 (3): 433-6.
- Sambrook J and Russell DW, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.,
- Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T and Kanakura Y. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells, *J Biol Chem*, 2008; 283 (44): 30045-56.
- Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, Haferlach C and Haferlach T. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis, *Blood*, 2011; 117 (8): 2348-57.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell, *Blood Cells*, 1978; 4 (1-2): 7-25.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J and Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages, *Science*, 1994; 265 (5178): 1573-7.

- Scott LM, Civin CI, Rorth P and Friedman AD. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells, *Blood*, 1992; 80 (7): 1725-35.
- Silva FP, Lind A, Brouwer-Mandema G, Valk PJ and Giphart-Gassler M. Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients, *Haematologica*, 2007; 92 (8): 1123-6.
- Silva FP, Swagemakers SM, Erpelinck-Verschueren C, Wouters BJ, Delwel R, Vrieling H, van der Spek P, Valk PJ and Giphart-Gassler M. Gene expression profiling of minimally differentiated acute myeloid leukemia: M0 is a distinct entity subdivided by RUNX1 mutation status, *Blood*, 2009; 114 (14): 3001-7.
- Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE and Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells, *Blood*, 1996; 88 (4): 1234-47.
- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM and Gilliland DG. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia, *Nat Genet*, 1999; 23 (2): 166-75.
- Spangrude GJ, Heimfeld S and Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells, *Science*, 1988; 241 (4861): 58-62.
- Speck NA and Terryl S. A new transcription factor family associated with human leukemias, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1995; 5 (3-4): 337-64.
- Speck NA and Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia, *Nat Rev Cancer*, 2002; 2 (7): 502-13.
- Spitz F and Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control, *Nat Rev Genet*, 2012; 13 (9): 613-26.
- Stadtfeld M and Graf T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing, *Development*, 2005; 132 (1): 203-13.
- Stewart M, Terry A, Hu M, O'Hara M, Blyth K, Baxter E, Cameron E, Onions DE and Neil JC. Proviral insertions induce the expression of bone-specific isoforms of PEBP2alphaA (CBFA1): evidence for a new myc collaborating oncogene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94 (16): 8646-51.
- Sun W and Downing JR. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors, *Blood*, 2004; 104 (12): 3565-72.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK and Kundu TK. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription, *Mol Cell Biol*, 2005; 25 (17): 7534-45.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L and Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*, 2009; 324 (5929): 930-5.
- Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S and Ogata K. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta, *Cell*, 2001; 104 (5): 755-67.

- Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N and Kishimoto T. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages, *Cell*, 1995; 80 (2): 353-61.
- Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI and Tien HF. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations, *Blood*, 2009; 114 (26): 5352-61.
- Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y and Littman DR. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development, *Cell*, 2002; 111 (5): 621-33.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD and Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia, *Blood*, 1997; 90 (2): 489-519.
- Tighe JE and Calabi F. Alternative, out-of-frame runt/MTG8 transcripts are encoded by the derivative (8) chromosome in the t(8;21) of acute myeloid leukemia M2, *Blood*, 1994; 84 (7): 2115-21.
- Tighe JE and Calabi F. t(8;21) breakpoints are clustered between alternatively spliced exons of MTG8, *Clin Sci (Lond)*, 1995; 89 (3): 215-8.
- Timchenko N, Wilson DR, Taylor LR, Abdelsayed S, Wilde M, Sawadogo M and Darlington GJ. Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding, *Mol Cell Biol*, 1995; 15 (3): 1192-202.
- Turhan AG, Lemoine FM, Debert C, Bonnet ML, Baillou C, Picard F, Macintyre EA and Varet B. Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 1995; 85 (8): 2154-61.
- Vaillant F, Blyth K, Terry A, Bell M, Cameron ER, Neil J and Stewart M. A full-length Cbfa1 gene product perturbs T-cell development and promotes lymphomagenesis in synergy with myc, *Oncogene*, 1999; 18 (50): 7124-34.
- Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A and Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), *Nucleic Acids Res*, 2004; 32 (14): 4100-8.
- Vegesna V, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, Tavor S, Krug U, Fermin AC, Heaney A, Miller CW and Koeffler HP. C/EBP-beta, C/EBP-delta, PU.1, AML1 genes: mutational analysis in 381 samples of hematopoietic and solid malignancies, *Leuk Res*, 2002; 26 (5): 451-7.
- Wang D, D'Costa J, Civin CI and Friedman AD. C/EBPalpha directs monocytic commitment of primary myeloid progenitors, *Blood*, 2006; 108 (4): 1223-9.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH and Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93 (8): 3444-9.
- Wang QF and Friedman AD. CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor, *Blood*, 2002; 99 (8): 2776-85.
- Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR and Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor, *Mol Cell Biol*, 1993; 13 (6): 3324-39.

- Wang X, Scott E, Sawyers CL and Friedman AD. C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts, *Blood*, 1999; 94 (2): 560-71.
- Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L and Dick JE. Concepts of human leukemic development, *Oncogene*, 2004; 23 (43): 7164-77.
- Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schutte J, Kaimakis P, Chilarska PM, Kinston S, Ouwehand WH, Dzierzak E, Pimanda JE, de Bruijn MF and Gottgens B. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators, *Cell Stem Cell*, 2010; 7 (4): 532-44.
- Wotton S, Stewart M, Blyth K, Vaillant F, Kilbey A, Neil JC and Cameron ER. Proviral insertion indicates a dominant oncogenic role for Runx1/AML-1 in T-cell lymphoma, *Cancer Res*, 2002; 62 (24): 7181-5.
- Wotton S, Terry A, Kilbey A, Jenkins A, Herzyk P, Cameron E and Neil JC. Gene array analysis reveals a common Runx transcriptional programme controlling cell adhesion and survival, *Oncogene*, 2008; 27 (44): 5856-66.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R and Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies, *Blood*, 2001; 97 (8): 2434-9.
- Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A and Xanthopoulos KG. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997a; 94 (24): 13187-92.
- Yamanaka R, Kim GD, Radomska HS, Lekstrom-Himes J, Smith LT, Antonson P, Tenen DG and Xanthopoulos KG. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997b; 94 (12): 6462-7.
- Yanagida M, Osato M, Yamashita N, Liqun H, Jacob B, Wu F, Cao X, Nakamura T, Yokomizo T, Takahashi S, Yamamoto M, Shigesada K and Ito Y. Increased dosage of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice, *Oncogene*, 2005; 24 (28): 4477-85.
- Yeamans C, Wang D, Paz-Priel I, Torbett BE, Tenen DG and Friedman AD. C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment, *Blood*, 2007; 110 (9): 3136-42.
- Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T and Suda T. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche, *Cell Stem Cell*, 2007; 1 (6): 685-97.
- Zhang DE, Fujioka K, Hetherington CJ, Shapiro LH, Chen HM, Look AT and Tenen DG. Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1), *Mol Cell Biol*, 1994; 14 (12): 8085-95.
- Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW and Tenen DG. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter, *Mol Cell Biol*, 1996; 16 (3): 1231-40.

- Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ and Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94 (2): 569-74.
- Zhang J, Hug BA, Huang EY, Chen CW, Gelmetti V, Maccarana M, Minucci S, Pelicci PG and Lazar MA. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction, *Mol Cell Biol*, 2001; 21 (1): 156-63.
- Zhang MQ. A discrimination study of human core-promoters, Pac Symp Biocomput, 1998; 240-51.
- Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG and Sun Z. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96 (15): 8705-10.
- Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K and Tenen DG. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha, *Immunity*, 2004; 21 (6): 853-63.
- Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, Larson RA and Rowley JD. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99 (5): 3070-5.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W and Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS), *Genome Biol*, 2008; 9 (9): R137.
- Zheng R, Friedman AD and Small D. Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations, *Blood*, 2002; 100 (12): 4154-61.
- Zhu J and Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment, *Oncogene*, 2002; 21 (21): 3295-313.
- Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM and Tsichlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor, *Mol Cell Biol*, 1996; 16 (8): 4024-34.

8 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
5-FU	5-Fluoruracil
AGM	Aorten-Gonaden-Mesonephron
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APL	akute Promyelozytenleukämie
B6	C57BL/6
BCR	breakpoint cluster region
Вр	Basenpaar
BSA	fötales Kälberserum (bovine serum albumine)
bZIP	basic-leucin-zipper
CBF	core-binding-factor
CD	cluster of differenciation
CEBPa	CCAAT-enhancer-binding-protein-α
CEBPε	CCAAT-enhancer-binding-protein-ε
CFU	colony-forming-units
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CLP	allgemeiner lymphatischer Progenitor (common lymphoid progenitor)
CMP	allgemeiner myeloischer Progenitor (common myeloid progenitor)
Cmp	Counts per minute
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (Colony Stimulating Factor)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
DBM	DNA-Bindungsmutation
DN	doppelt negativ (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	doppelt positiv (CD4+ CD8+)
Env	Gen für retrovirale Hüllproteine
Еро	Eryhropoetin
EryP	Erythrozyten-Progenitor
ESZ	embryonale Stammzellen
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch (French-American-British)
FACS	fluoreszens-activated cell sorting
FLT3	FMS-like Tyrosin Kinase 3
FPD/AML	Familial Platelet Disorder with propensity to AML
FPKW	fragments per kilobase per million sequenced reads
Gag	Gen für retrovirale Kapsidproteine
gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-CSF
Gfi1	growth factor independent 1 transcription repressor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-CSF

GMP	Granulozyten-Monozyten-Progenitor
HAT	Histon-Acetytransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
ITD	interne Tandem-Duplikation
KD	Kinase Domäne
kDA	Kilodalton
LT-HSZ	Long Term-HSZ
MafB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
M-CSF	Makrophagen-CSF
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
MegP	Megakaryozyten-Progenitor
MoMLV	Moloney murine leukemia virus
MPP	Multipotenter Progenitor (multipotent progenitor)
NLS	Kernlokalisationssignales
NMS	nukleären Matrixsignales
PCR	Polymerase-Kettenraktion (polymerase chain reaction)
PDGF	platelet-derived growth factor
Pol	Gen für retrovirale Polymerase-Enzyme
q <i>RT</i> -PCR	quantitative Ecthzeit (real time)-PCR
RAR	Retinsäurerezeptor (Retinoicacid receptor)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SP	einfach positiv (<i>single positive</i>)
ST-HSZ	Short Term-HSZ
SZ	Stammzelle
TCA	Trichloressigsäure (Trichlororacetic acid)
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
хg	Fallbeschleunigung

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Seite

Tab. 1:	Fluoreszenzmarkierte Antikörper für Durchflusszytometrie	34
Tab. 2:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	36
Tab. 3:	Beteiligung hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Organe	
	an den verschiedenen Erkrankungen	85
Abb. 1 :	Schematische Übersicht der adulten Hämatopoese	7
Abb. 2 :	Kooperrative Bindungsmechanismen	11
Abb. 3 :	Domänenstruktur von RUNX1	21
Abb. 4 :	RUNX1-Keimbahnmutation in Stammbäumen mit familiärer Plättchen Dysplasie (FDP/AML)	25
Abb. 5 :	Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen zur	
	Genotypisierung der konditional Runx1-deletierten Mäuse	45
Abb. 6 :	Die Deletion von Runx1 führt zu einer Expansion des myeloischen	
	Progenitorkompartiments	57
Abb. 7 :	Der Verlust von Runx1 beeinträchtigt die myeloische Differenzierung	60
Abb. 8 :	Der Knock out von <i>Runx1</i> führt zu einer Vermehrung unreifer myeloischer Zellen im Knochenmark	61
Abb. 9 :	Runx1 hat keinen Einfluss auf die G vs. M Differenzierungsentscheidung	64
Abb. 10:	Der Verlust von Runx1 in GMPs führt zu einer verstärkten Expression HSZ-spezifischer Gene	67
Abb. 11:	Etablierung eines induzierbaren RUNX1-Überexpressionssystems	69
Abb. 12:	Das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein rettet den Differenzierungsdefekt Runx1-defizienter GMPs	71
Abb. 13:	In vivo RUNX1-Überexpressionsmodell zur Identifikation direkter	
	RUNX1-Zielgene	73
Abb. 14:	Charakterisierung der murinen Progenitorzelllinie FDC-P1	75
Abb. 15:	Western Blot zur Analyse der Überexpression des RUNX1-ERt2- Fusionsproteins in FDC-P1-Zellen	76
Abb. 16:	Genom-weite Analyse der Runx1-Bindung in FDC-P1 Zellen	78
Abb. 17:	Überexpression von RUNX1 bzw. RUNX1 ^{R135G} und FLT3-ITD im Runx1 $^{\Delta/\Delta}$ -Hintergrund.	82
Abb. 18:	Analyse des Milzgewichts und der Blutparameter/ Blutzellmorphologie	84
Abb. 19:	Histologischer Befund der Milzen und Nieren erkrankter Mäuse	86

Abb. 20:	Histologischer Befund einer leukämischen Maus (21-#13)	88
Abb. 21:	Charakterisierung der Thymome	90
Abb. 22:	Charakterisierung der myeloproliferativen Neoplasie	91
Abb. 23:	Charakterisierung der akuten myeloischen Leukämie	92
Abb. 24:	Vergleich der Genexpressionsprofile leukämischer Blasten und	
	früher Vorläufer	93
Abb. 25:	Modell zur AML-Entstehung	106

10 Anhang

A-Tab. 1: akute Leukämien. Im oberen Teil der Tabelle sind das Milzgewicht, die Blutparameter, das Überleben und die Infektionsraten der unterschiedlichen Organe mit einfach oder doppelt infizierten Zellen (Infektion) dargestellt. Der untere Teil der Tabelle gibt den Anteil infizierter Zellen wieder, die für das jeweilige Oberflächenantigen positiv waren.

	Transduktion				Blutwerte)			Infektion		Infektionsraten (%)		
Maus-			Über-	Milz-	WBC	RBC	Hb	PLT		Pb	KM	Milz	Leber
ID			leben	gewicht	x 10 ⁶ /ml	x 10 ⁹ /ml	(g/dL)	x 10 ⁶ /ml					
			(Tage)	(mg)									
21-#13	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	57	761	81,74	7,49	9,10	128	GFP/BFP	86	78	89	n.d.
21-#17	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	73	742	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	GFP/BFP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21-#12	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	75	809	8,90	7,79	10,70	73	GFP/BFP	20	52	85	78
21-#14	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	75	683	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	GFP/BFP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21-#10	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	88	823	22,50	6,53	9,30	65	GFP*	61	54	91	77
20-#14	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	169	218	11,58*	2,89	4,40	899	GFP/BFP	14	50	53	75
20-#21	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	193	590	12,38	4,97	7,80	70	GFP/BFP	34	32	63	71

* BFP-Expression gesilenced siehe A-Abb.1

	КМ					Milz					Leber					
Maus-	CD11b+	Kit+	CD4+	CD19+	Ter119+	CD11b+	Kit+	CD4+	CD19+	Ter119+	CD11b+	Kit+	CD4+	CD19+	Ter119+	
ID																
21-#13	2	0	0	0	11	0	0	0	0	4	2	0	0	0	20	
21-#17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
21-#12	5	50	3	2	2	14	4	2	27	6	1	3	2	3	2	
21-#14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
21-#10	5	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
20-#14	10	68	3	0	7	3	65	1	2	2	5	61	1	0	1	
20-#21	11	1	2	1	9	4	0	1	0	2	1	0	0	0	3	

A-Tab. 2: myeloproliferative Neoplasien. Im oberen Teil der Tabelle sind das Milzgewicht, die Blutparameter, das Überleben und die Infektionsraten der unterschiedlichen Organe mit einfach oder doppelt infizierten Zellen (Infektion) dargestellt. Der untere Teil der Tabelle gibt den Anteil infizierter Zellen wieder, die für das jeweilige Oberflächenantigen positiv waren. Die ersten drei Tiere wurden mit Tamoxifen behandelt, die anderen beiden Tiere waren Kontrolltiere

	Transdukti	on			Blutwerte)	Infektion	Infektionsraten (%			(%)		
Maus-			Über-	Milz-	WBC	RBC	Hb	PLT		pb	KM	Milz	Leber
ID			leben	gewicht	x 10 ⁶ /ml	x 10 ⁹ /ml	(g/dL)	x 10 ⁶ /ml					
			(Tage)	(mg)									
20-#20	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	42	252	7,74	10,96	13,90	248	BFP	74	79	86	n.d.
20-#29	ERt2	FLT3-ITD	111	210	6,58	8,37	11,8	371	BFP	n.d.	66	58	n.d.
20-#10	RUNX1 R135G-ERt2	FLT3-ITD	118	192	8,94	9,13	13,30	543	GFP/BFP	78	92	80	35
20-#1	RUNX1 R135G-ERt2	FLT3-ITD	182	323	47,38	9,21	13,4	276	BFP	94	91	92	86
20-#40	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	92	554	17,22	7,39	9,5	105	BFP	79	79	76	71

		KM			Milz		Leber				
Maus-	CD11b+	Gr1+	CD11b+	CD11b+	Gr1+	CD11b+	CD11b+	Gr1+	CD11b+		
ID			Gr1+			Gr1+			Gr1+		
20-#20	81	79	79	94	76	75	81	79	79		
20-#29	76	78	75	83	76	75	76	78	75		
20-#10	95	93	93	91	82	82	95	93	93		
20-#1	98	98	92	98	92	92	98	98	92		
20-#40	75	71	71	92	83	83	75	71	71		

	Transduktion				Blutwerte)			Infektion
Maus-			Über-	Milz-	WBC	RBC	Hb	PLT	
ID			leben	gewicht	x 10 ⁶ /ml	x 10 ⁹ /ml	(g/dL)	x 10 ⁶ /ml	
			(Tage)	(mg)					
20-#34	ERt2	FLT3-ITD	104	400	47,44	8,08	10,8	160	uninfiziert
21-#19	ERt2	FLT3-ITD	121	94	1,58	9,11	12,50	397	uninfiziert
20-#32	ERt2	FLT3-ITD	172	274	29,56	3,67	5,8	58	uninfiziert
21-#23	ERt2	FLT3-ITD	190	523	2,16	3,36	4,60	43	uninfiziert
20-#31	ERt2	FLT3-ITD	208	108	1,52	6,31	9,8	209	uninfiziert
21-#25	ERt2	FLT3-ITD	221	211	5,84	9,51	12,30	142	uninfiziert
21-#18	ERt2	FLT3-ITD	239	448	52,08	7,13	9,70	162	uninfiziert
20-#11	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	158	622	25,64	5,32	8,90	130	uninfiziert
21-#8	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	173	509	23,18	6,39	8,10	132	uninfiziert
21-#3	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	173	385	32,08	2,91	6,00	79	uninfiziert
20-#12	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	244	255	12,26	8,47	12,70	175	uninfiziert

A-Tab. 3: Thymome. Im oberen Teil der Tabelle sind das Überleben, das Milzgewicht und die Blutparameter dargestellt. Der untere Teil der Tabelle gibt den Anteil der Zellen wieder, die für das jeweilige Oberflächenantigen positiv waren.

		K	М		Milz				Leber				Thymus			
Maus-	CD4+	CD8+	CD4+	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+	CD3+
ID			CD8+				CD8+				CD8+				CD8+	
20-#34	37	66	36	7	42	97	41	11	21	95	21	29	33	97	32	32
21-#19	n.d.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d							
20-#32	99	99	99	3	97	99	97	2	96	99	96	5	64	100	64	4
21-#23	83	87	82	4	96	97	96	4	90	92	88	6	91	94	91	7
20-#31	5	7	1	7	32	32	13	45	55	35	22	65	90	67	95	82

21-#25	94	95	94	8	87	85	82	14	65	72	62	26	n.d	n.d	n.d	n.d
21-#18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	91	10	n.d	2	99	2	n.d	38	96	30	n.d
20-#11	66	43	43	57	98	71	71	81	98	57	56	47	95	57	54	78
21-#8	94	96	94	1	96	96	96	5	88	92	86	2	89	89	88	14
21-#3	27	86	16	70	32	70	19	88	8	74	4	92	33	80	29	76
20-#12	78	81	94	2	88	89	86	2	91	90	88	4	99	98	97	1

A-Tab. 4: Parameter gesunder, transplantierter Versuchsmäuse mit Infektionsraten <5%. Im oberen Teil der Tabelle sind das Überleben, das Milzgewicht und die Blutparameter dargestellt. Der untere Teil der Tabelle gibt den Anteil der Zellen wieder, die für das jeweilige Oberflächenantigen positiv waren.

	Transduktion				Blutwerte)			Infektion
Maus-			Über-	Milz-	WBC	RBC	Hb	PLT	
ID			leben	gewicht	x 10 ⁶ /ml	x 10 ⁹ /ml	(g/dL)	x 10 ⁶ /ml	
			(Tage)	(mg)					
20-#25	ERt2	FLT3-ITD	191	121	1,76	9,06	13,8	169	<10%
21-#24	ERt2	FLT3-ITD	190	123	2,02	7,11	9,7	56	<10%
20-#37	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	104	110	3,26	9,18	12,1	337	<10%
21-#6	RUNX1 ^{R135G} -ERt2	FLT3-ITD	38	141	1,26	5,50	7,7	159	<10%
20-#22	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	256	144	1,82	7,07	10,8	248	<10%
21-#9	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	80	197	4,86	7,78	11,8	274	<10%
21-#16	RUNX1-ERt2	FLT3-ITD	138	99	2,42	1,78	2,5	239	<10%

	КМ						Milz					
Maus-	CD11b+	Gr1+	CD11b+	CD4+	CD8+	CD4+	CD11b+	Gr1+	CD11b+	CD4+	CD8+	CD4+
ID			Gr1+			CD8+			Gr1+			CD8+
20-#25	43,0	42,5	39,4	1,5	2,6	2,4	23,1	22,2	16,8	20,2	8,7	1,6
21-#24	50,5	49,2	45,9	2,6	5,7	0,3	52,6	63,5	44,0	14,3	12,8	0,3
20-#37	55,0	53,5	51,4	0,9	1,6	0,0	21,5	30,4	16,4	18,6	14,6	0,7
21-#6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20-#22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,6	21,7	9,6	18,3	13,8	0,7
21-#9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21-#16	70,3	70,4	64,9	3,0	5,9	0,1	30,6	38,4	21,1	14,9	17,2	0,8



A-Abb. 1:Southern Blot-Analyse zur Bestätigung der Integration des FLT3-ITD/GFP codierenden Retrovirus. A) Schematische Darstellung der Proviren mit Restriktionsschnittstellen für EcoRV und Hind III **B)** Aus den Milzen transplantierter Mäuse wurde genomische DNA extrahiert und diese mit den Restriktionsenzymen EcoRV und HindIII geschnitten. Als Sonden dienten ₃₂P-markierte 0,7kb große Fragmente aus für GFP bzw. BFP codierenden Vektoren. Um die DNA-Menge und den Restriktionsverdau zu überprüfen wurde eine Sonde gegen das endogene *II3ra* (rechts) verwendet. Restringierte, genomische DNA aus der Milz einer B6-Maus diente als Kontrolle. In beiden transplantierten Mäusen konnte die Integration beider Proviren nachgewiesen werden (Pfeile).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Carol Stocking für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit am HPI anzufertigen. Vielen Dank für Deine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Bei Herrn Prof. Thomas Dobner und Herrn Prof. Boris Fehse möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie mir durch ihr Interesse und die Betreuung des Promotionsvorhabens die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Prof. Jürgen Löhler danke ich herzlich für seine Hilfestellung während der Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen, sowie die vielen hilfreichen Tipps in diesem Zusammenhang.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Kolleginnen sowie ehemaligen Kolleginnen in der Abteilung Molekulare Pathologie. Zum einen für die Expertise in besondere aller technischen Mitarbeiterinnen, die mir die Arbeit während der gesamten Zeit sehr erleichtert hat. Zum anderen aber auch für die schöne Atmosphäre und die immer wieder aufmunternden Worte während der letzten Wochen.

Dem gesamten Team der Tierhaltung, insbesondere Mathias Timmermann, Ines Jambor, sowie Ulla Müller, gilt ein ganz besonderer Dank. Danke, dass ihr mit immer mit Rat und Tat zur Seite standet.

Auch Arne Düsedau, Malik Alawi und Daniela Indenbirken sei gedankt für eure Hilfe und Geduld bei allem was Durchflusszytometrie bzw. NGS angeht.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde, die immer ein offenes Ohr hatten, ins Besondere während der letzten Wochen und in mühevoller Kleinarbeit Korrekturen dieser Arbeit vorgenommen haben.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, Oktober 2013

Kira Behrens