

**Funktion des Mef2c-Transkriptionsfaktors während der  
normalen und aberranten Hämatopoese in *Mus musculus*  
(Linnaeus, 1758)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am  
Department Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Universität Hamburg

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Andrea Schüler  
geboren in Simmern

Hamburg, April 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. B. FEHSE  
Tag der Disputation: 19. Juni 2009

Hamburg, den 05. Juni 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit entstand in der Zeit von November 2005 bis April 2009 am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie der Universität Hamburg in der Abteilung Molekulare Pathologie unter Anleitung von Frau Carol Stocking, PhD.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit ist in Schüler und Schwieger *et al.* The MADS transcription factor Mef2c is a pivotal modulator of myeloid cell fate. *Blood* **111**, 4532-41(2008) veröffentlicht worden. Ein weiterer Teil wird in Kürze veröffentlicht (Schwieger und Schüler *et al.* Homing and invasiveness of MLL/ENL leukemic cells is regulated by MEF2C).

Meiner Mama

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1. Das Blut.....	3
2.1.1. Zelluläre Bestandteile des Blutes.....	3
2.2. Hämatopoese.....	4
2.2.1. Die embryonale und adulte Blutbildung.....	5
2.2.2. Die Hämatopoese von HSZ.....	6
2.3. Die Entwicklung myeloider Zelllinien.....	9
2.3.1. Wichtige myeloide Transkriptionsfaktoren.....	10
2.3.2. Wie wird die zelltyp-spezifische Expression dieser Transkriptionsfaktoren gesteuert?.....	12
2.4. Leukämie.....	16
2.4.1. Akute myeloische Leukämie (AML).....	17
2.4.2. Die leukämische Stammzelle (LSZ).....	20
2.5. Mixed Lineage Leukemia (MLL).....	21
2.5.1. Aufbau und Funktion der Wildtyp Form von MLL.....	22
2.5.2. Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen durch MLL/AF9 und MLL/ENL.....	24
2.6. Identifikation des MADS-box Transkriptionsfaktors Mef2c..... als möglichem Regulator in der Leukämogenese und Hämatopoese.....	25
2.6.1. Die Mef2 Familie der MADS-box Transkriptionsfaktoren.....	28
2.6.2. Aufbau, Expression und knock-out Studien der Mef2 Proteine.....	28
2.6.3. Funktion und Aktivitäts-beeinflussende Faktoren der Mef2 Proteine.....	30
2.6.4. Rolle der Mef2 Proteine während der Hämatopoese.....	31
<b>3. Fragestellung.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
4.1. Material.....	33
4.1.1. Kits.....	33
4.1.2. Mausstämme.....	33
4.1.3. Bakterienstämme.....	34
4.1.4. Zelllinien.....	34
4.1.4.1. primäre Zelllinien.....	34
4.1.4.2. murine Zelllinien.....	34
4.1.5. Medien.....	35
4.1.5.1. Bakterienkulturmedien.....	35

4.1.5.2.	Zellkulturmedien und -lösungen.....	35
4.1.6.	Standardpuffer und Proteingele.....	36
4.1.7.	Antikörper.....	37
4.1.7.1.	primäre Antikörper.....	37
4.1.7.2.	sekundäre Antikörper.....	37
4.1.7.3.	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	38
4.1.8.	Plasmide.....	38
4.1.8.1.	Helferplasmide für die Virusproduktion.....	38
4.1.8.2.	Retrovirale Konstrukte.....	38
4.1.9.	Oligonukleotide.....	39
4.1.10.	Geräte.....	40
4.2.	Methoden.....	40
4.2.1.	Zellkultur.....	40
4.2.1.1.	Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	40
4.2.1.2.	Kultivierung von Suspensionszellen.....	41
4.2.1.3.	Auftauen und Einfrieren von Suspensionszellen.....	41
4.2.2.	Analyse von Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Analyse).....	41
4.2.2.1.	Sortieren von Zellen.....	42
4.2.3.	Herstellung infektiöser Viruspartikel.....	42
4.2.3.1.	Titerbestimmung.....	43
4.2.4.	Einsatz infektiöser Viruspartikel.....	44
4.2.4.1.	Isolierung von Knochenmarkzellen.....	44
4.2.4.2.	Infektion von Zellen mit gammaretroviralen Konstrukten.....	45
4.2.5.	Linien-negatives Knochenmark, infiziert mit MLL/ENL-Vektoren; Herstellung einer transformierten Zelllinie.....	45
4.2.6.	Anreicherung infizierter Zelllinien.....	46
4.2.7.	Infektion von Linien-negativen Knochemarkzellen mit lentiviralen Konstrukten.....	46
4.2.8.	Colony-Forming-Assay.....	47
4.2.9.	Vorbereitung von infizierten Knochenmarkzellen und M/E-Zellen für die Transplantation.....	47
4.2.10.	Cobblestone-Formations-Assay.....	48
4.2.11.	Quantitative Migrationsversuche <i>in vitro</i> .....	48
4.2.12.	Stimulation von Zellen mit Lipopolysaccharid.....	49
4.2.13.	Vorbereitung von M/E/iPac bzw. /Mef2c <sup>ASR</sup> für die Microarray Analyse.....	49
4.2.14.	Mausmodell.....	49
4.2.15.	Quantitative Migrationsversuche <i>in vivo</i> .....	51

4.2.16.	Analyse erkrankter Tiere.....	51
4.2.16.1.	Analyse der Blutparameter.....	52
4.2.16.2.	Vorbereitung der Organe für die Durchflusszytometrie (FACS).....	52
4.2.16.3.	Histologische Methoden.....	53
4.2.17.	Nukleinsäure-analytische Methoden.....	53
4.2.17.1.	Standardmethoden.....	53
4.2.17.2.	Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	53
4.2.17.3.	Isolation von RNA.....	54
4.2.18.	PCR und Sequenzierung.....	55
4.2.19.	Proteinbiochemische Methoden.....	58
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
5.1.	Ist Mef2c ein Zielgen von MLL/ENL im Kontext der ..... leukämischen Transformation?.....	60
5.1.1.	Mef2c ist nicht wichtig für die Etablierung und Erhaltung einer mit ..... M/E-transformierten Zelllinie.....	60
5.2.	Charakterisierung des Phänotyps der M/E-transformierten Zellen ..... mit und ohne Mef2c <i>in vitro</i> .....	63
5.2.1.	M/E-Mef2c-überexprimierende Zellen zeigen eine erhöhte Migrationskapazität auf MS-5 Stromazellen.....	64
5.2.2.	Mef2c führt zu einer vergrößerten Subpopulation mit ..... Oberflächenexpression des Homing- und Migrations-assoziierten ..... Rezeptors Cxcr4.....	65
5.2.3.	Quantifizierung der Migrationskapazität von Mef2c-exprimierenden ..... und -defizienten M/E-Zellen.....	66
5.2.4.	Expression des Cxcr4-Transkriptes in Mef2c-exprimierenden ..... und -defizienten M/E-Zellen.....	68
5.3.	Herstellung einer konstitutiv aktiven Form von Mef2c.....	68
5.3.1.	Mef2c <sup>ASR</sup> führt zu einer vergrößerten Cxcr4-exprimierenden ..... Subpopulation und verstärkter Migration der M/E-Zellen.....	71
5.4.	Das gesamtgenomische Expressionsprofil M/E-transformierter Zellen.....	73
5.4.1.	Die Transduktion der M/E-Zellen mit Mef2c <sup>ASR</sup> führt zur ..... Hochregulation von verschiedenen Chemokinrezeptoren- und ..... -liganden-, sowie Matrix-Metalloprotease (Mmp)-Genen.....	73
5.5.	Mef2c führt zu erhöhter Homing Kapazität von Knochenmarkzellen <i>in vivo</i> ....	76
5.6.	Mef2c führt zu einer erhöhten Invasivität M/E-transformierter ..... Knochenmarkstammzellen.....	78
5.7.	Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial von Mef2c.....	82

5.7.1.	Differenzierungseigenschaften von B6- <i>Mef2c</i> <sup>+/+</sup> versus B6- <i>Mef2c</i> <sup>Δ/-</sup> .....	
	Knochenmarkzellen <i>in vitro</i> .....	83
5.7.2.	Differenzierungseigenschaften von C57Bl/6 Knochenmarkzellen nach.....	
	Überexpression von <i>Mef2c in vivo</i> .....	84
5.8.	Überexpression und Stimulation von <i>Mef2c</i> in Zelllinien.....	86
5.8.1.	Expressionslevel von Pu.1, C/ebpa und c-jun nach .....	
	(Über)expression von <i>Mef2c</i> in M/E-Zelllinie.....	86
5.8.2.	Der basische ZIP-Transkriptionsfaktor c-jun ist ein wichtiges .....	
	Zielgen des Transkriptionsfaktors <i>Mef2c</i> .....	88
5.9.	Überexpression von c-jun in Knochenmarkstammzellen.....	89
5.9.1.	Die Überexpression von c-jun in frühen Knochenmarkzellen .....	
	inhibiert die Granulopoese.....	90
5.10.	Überexpression von <i>Mef2c</i> in Verbindung mit einer .....	
	c-jun shRNA in Knochenmarkstammzellen.....	91
5.10.1.	Der <i>Mef2c</i> -assoziierte Differenzierungsblock wird .....	
	durch Herunterregulation von c-jun teilweise aufgehoben.....	92
5.11.	Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse.....	94
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
6.1.	<i>Mef2c</i> ist für den MLL/ENL-assoziierten Transformationsprozess .....	
	nicht erforderlich.....	96
6.2.	<i>Mef2c</i> erhöht die Migrationskapazität von MLL/ENL transformierten .....	
	Zellen und führt zu einer Vergrößerung der Cxcr4-exprimierenden .....	
	Subpopulation innerhalb des MLL/ENL-Zellpools .....	99
6.3.	<i>Mef2c</i> beeinflusst die Expression Migrations-assoziiierter Gene.....	103
6.4.	<i>Mef2c</i> induziert die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen aus.....	
	granulozytären/monozytären Vorläuferzellen.....	107
6.5.	<i>Mef2c</i> induziert das für die monozytäre Entwicklung wichtige Gen c-jun.....	109
6.6.	Die nach <i>Mef2c</i> -Expression erhöhte c-jun Expression trägt .....	
	zur verminderten Granulopoese bei.....	111
6.7.	<i>Mef2c</i> als Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese.....	113
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>118</b>

## 1. Zusammenfassung

Während des homöostatisch sehr fein abgestimmten Prozesses der Hämatopoese ist besonders die Aktivität und Menge von Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Eine grundlegende Erforschung des Ablaufes der gesunden Hämatopoese ist dementsprechend unabkömmlich, um die Ursachen von Blutzellentartungen, die zur Entstehung von Leukämie führen können, zu identifizieren.

Der *Myocyte Enhancer Factor 2 c* (Mef2c) ist ein Mitglied der Familie der MADS-box Transkriptionsfaktoren und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Muskel- und Nervenzellen. Aufgrund zweier Beobachtungen wurde in dieser Arbeit eine mögliche, neue Funktion von Mef2c während der Hämatopoese und Leukämogenese untersucht: *MEF2C* ist in einigen Proben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) hochreguliert, und dies ist teilweise korreliert mit einer Translokation des *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL*)-Gens. Weiterhin konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die Überexpression von Mef2c in einem von uns etablierten Mausmodell der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zur Induktion einer akuten myelomonozytären Leukämie führt.

Zunächst wurde untersucht, ob die leukämische Transformation früher, muriner Knochenmarkzellen durch ein *MLL*-Fusionsprotein – *MLL/ENL* (M/E) – in Abhängigkeit von Mef2c erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass Mef2c zwar nicht für die Etablierung und Erhaltung von M/E-transformierten Zelllinien notwendig ist, aber eine wichtige Stammzeleigenschaft auf M/E-transformierte Zellen überträgt. Diese äußert sich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in Form erhöhter Homing- und Migrationskapazität. Innerhalb der M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen konnte eine vergrößerte Population identifiziert werden, die den Stammzell- und Homing-assoziierten Rezeptor *Cxcr4* exprimiert. Die Untersuchung der Expression von *Cxcr4* ergab, dass eine Regulation durch Mef2c am wahrscheinlichsten auf Proteinebene erfolgt, da auch M/E-Mef2c-defiziente Zellen die *Cxcr4*-mRNA stark exprimieren. Mit Hilfe einer gesamtgenomischen Expressionsanalyse konnte in M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen die Hochregulation weiterer Migrations-assoziiierter Gene, die für Chemokinrezeptoren- und -liganden, sowie für Matrix-Metalloproteasen codieren, gefunden werden. Mit diesem Befund kann auch die *in vivo* beobachtete erhöhte Aggressivität M/E-Mef2c-exprimierender leukämischer Knochenmarkzellen nach Transplantation in konditionierte Mäuse erklärt werden.

Analysen an gesunden murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ergaben auch eine Funktion von Mef2c während der normalen Hämatopoese. Während Mef2c-defiziente Knochenmarkzellen eine verminderte Fähigkeit zur Monopoese aufweisen, resultiert die konstitutive Überexpression von Mef2c in hämatopoetischen Vorläuferzellen in einer verstärkten Monopoese auf Kosten der

Granulopoese. In beiden Fällen wurden myeloide Zytokine zur Stimulation der Knochenmarkszellen eingesetzt. Mechanistische Studien zeigten, dass der Verlust der Mef2c-Expression mit einer reduzierten Expression des Transkriptionsfaktors c-jun einhergeht. Wird c-jun in murinem Knochenmark überexprimiert, führt dies – wie auch die Mef2c Überexpression – zu einer verstärkten monozytären/makrophagialen Differenzierung. Die Reduktion des c-jun Expressionsniveaus mit Hilfe von *short-hairpin* (sh)-RNA Vektoren revertiert den durch Mef2c hervorgerufenen monozytären/makrophagialen Phänotyp teilweise. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass c-jun ein kritisches nachgeschaltetes Zielgen von Mef2c während der Monopoese ist. Mef2c spielt auf diese Weise eine wichtige Rolle in der Entscheidung zwischen mono- und granulozytärer Differenzierung, was durch äußere Stimuli beeinflusst werden kann.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der MADS-box Transkriptionsfaktor Mef2c ein wichtiger Regulator der Informationsvermittlung zwischen extra- und intrazellulären Prozessen während der Hämatopoese darstellt. Die extrazelluläre Stimulation früher Knochenmarkszellen beeinflusst über Mef2c-involvierende Signalwege die Myelopoese. Dies äußert sich in einer verstärkten Entwicklung von Monozyten/Makrophagen auf Kosten von Granulozyten. Im Einklang mit der verstärkten makrophagialen Entwicklung Mef2c-überexprimierender, früher Knochenmarkszellen steht die Erhöhung der migratorischen Kapazität von leukämischen, M/E-transformierten Stammzellen. Neben der Migrationskapazität ist eine weitere wichtige Stammzeleigenschaft – die Homingkapazität – der M/E-transformierten leukämischen Zellen erhöht.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Das Blut**

Das Herz-Kreislauf-System ist eines der wichtigsten Organe der Wirbellosen und Wirbeltiere, inklusive des Menschen. Dies wird besonders deutlich aufgrund der Tatsache, dass alle tierischen Lebensformen eine Art Kreislaufsystem ausgebildet haben, sobald das Oberfläche-Volumen-Verhältnis zu groß ist, um die Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff über die Oberfläche, beziehungsweise mit Nährstoffen über den Verdauungstrakt garantieren zu können.

Hauptbestandteil des geschlossenen Herz-Kreislauf-Systems von Säugetieren sind das Herz und die Blutgefäße. Durch die regelmäßige Kontraktion des Herzmuskels kann das Blut durch den gesamten Körper gepumpt werden, wodurch die Versorgung aller Organe des Organismus gewährleistet wird. Beim Menschen besteht das Blut zu etwa 55% aus dem proteinreichen, wässrigen Blutplasma, welches unter anderem als Träger für die zellulären Bestandteile (Hämatokrit, etwa 44%) dient. Weiterhin enthält das Blutplasma Salze, Nährstoffe und gelöste Gase zur Versorgung des Stoffwechsels aller Körperzellen, während Stoffwechselprodukte über das Blut zu den Ausscheidungsorganen transportiert werden. Auch niedrigmolekulare Substanzen wie Hormone oder Wachstumsfaktoren, die als Botenstoffe zur Informationsübermittlung innerhalb des Körpers dienen, werden über das Blutplasma transportiert. So kann zum Beispiel die Thermoregulation, die Immunabwehr und die Blutbildung reguliert werden. Die Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff, sowie der Abtransport des Stoffwechselproduktes Kohlendioxid erfolgt ebenfalls über das Blutkreislaufsystem – diese Gase werden allerdings nicht gelöst, sondern gebunden an das Hämoglobin der roten Blutkörperchen (Erythrozyten), transportiert. Der Austausch der im Blut transportierten Stoffe mit den Organen und Geweben der Peripherie erfolgt über die dünnen Wände der fein verästelten Gefäße (Kapillaren) innerhalb dieser Bereiche (<sup>1</sup>Campbell, Biologie, 1998).

#### **2.1.1 Zelluläre Bestandteile des Blutes**

Für diese Arbeit spielen vor allem die zellulären Bestandteile des Blutes eine wichtige Rolle. Hauptsächlich werden hier die roten und weißen Blutkörperchen – Erythrozyten und Leukozyten – sowie die Blutplättchen (Thrombozyten) unterschieden. Den größten Anteil dieser Blutzellen nehmen mit 4,5 bis 6 Millionen Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut die Erythrozyten ein, gefolgt von 150.000 bis 350.000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut. Mit etwa 4.000 bis 10.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut sind die Leukozyten recht spärlich vertreten. Dies kann sich bei infektiösen Prozessen des Körpers schnell ändern (<sup>1</sup>Campbell, Biologie, 1998).

Bei den Leukozyten unterscheidet man die myeloiden und lymphoiden Zelllinien. Mit

60 bis 70% machen die Granulozyten, die weiter unterteilt werden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, den größten Teil der myeloiden Leukozyten aus. Auch Monozyten/Makrophagen gehören zur myeloiden Zelllinie, sind mit 2 bis 6% aber die seltenere Zellform unter diesen Leukozyten. Die lymphoide Zelllinie der Leukozyten umfasst 20 bis 30% der gesamten weißen Blutkörperchen und setzt sich aus B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen (engl. *natural killer*) zusammen. Die hier angegebenen Zahlenwerte entsprechen der Normalverteilung der zellulären Blutbestandteile im Menschen (<sup>1</sup>Campbell, Biologie, 1998).

Die Hauptfunktion dieser zellulären Bestandteile ist die Immunabwehr. Hier werden hauptsächlich die unspezifische angeborene und die spezifische erworbene Immunität unterschieden. Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen übernehmen dabei vor allem Funktionen der unspezifischen Immunabwehr und dienen so der primären Abwehrreaktion eines Organismus nach Detektion körperfremder Stoffe oder entarteter Körperzellen, welche phagozytiert und abgebaut werden. Neutrophile Granulozyten und Monozyten können zur weiteren Immunabwehr in Gewebe einwandern. Während erstere nur wenige Stunden im Blut zirkulieren um dann im Gewebe ein bis drei Tage zu überleben, können Monozyten bereits mehrere Tage im Blut patrouillieren, bevor sie nach Migration ins Gewebe weiter in Makrophagen differenzieren. Als solche können sie über mehrere Wochen bis Monate überleben und die Organe durchwandern. Monozyten sind nach Abbau der phagozytierten Substanzen befähigt zur Antigenpräsentation, neutrophile Granulozyten und Makrophagen produzieren zudem nach Kontakt mit und Phagozytose von körperfremden Stoffen eine Reihe von Substanzen wie Interleukine, Chemokine und Zytokine. Diese sezernierten Moleküle verstärken die weitere Reifung von Blutzellen aus Vorläuferzellen und aktivieren die spezifische, „erlernte“ Immunabwehr der B- und T-Lymphozyten. Letztere spielt eine besondere Rolle bei Wiederbefall des Organismus mit einem schon bekannten Fremdkörper, wodurch dieser schnell und effizient eliminiert werden kann (<sup>1</sup>Campbell, Biologie, 1998). Die Immunabwehr ist ein entscheidender Faktor für das Überleben eines Organismus. Da Blutzellen eine recht beschränkte Lebensdauer aufweisen darf die Entwicklung des „flüssigen Organes“ Blut kein einmalig während der Embryogenese stattfindender Prozess sein. Auch ein adulter Organismus muss während seiner gesamten Lebensdauer in der Lage sein, alle zellulären Bestandteile des Blutes immer wieder neu zu bilden und bereit zu stellen. Dieser komplizierte und homöostatisch sehr fein abgestimmte Prozess wird Hämatopoese genannt und wird im Folgenden näher beschrieben.

## 2.2 Hämatopoese

Unter Hämatopoese versteht man sowohl den Prozess der embryonalen und adulten Blutbildung, als auch die Funktion von adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) sich

selbst zu erneuern, zu proliferieren und zu differenzieren. So kann ein kleines Reservoir an HSZ (< 0,1% der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks) das gesamte Blutsystem regenerieren, weil diese als Ursprungszellen für alle Blutzellen dienen. Beide Prozesse werden im Folgenden am Beispiel der murinen Hämatopoese näher erläutert.

### 2.2.1 Die embryonale und adulte Blutbildung

Die ersten hämatopoetischen Zellen des murinen Embryos leiten sich aus dem Mesoderm ab und entstehen ab etwa Tag E7.0 bis E7.5 *post coitum* (*p.c.*). Mesodermale Vorläuferzellen (Hämangioblasten) wandern während der Gastrulation des Embryos zunächst in den extraembryonalen Dottersack und werden dort unter anderem durch Kontakt mit primitiven endodermalen Vorläuferzellen spezifiziert. Es folgt eine Weiterentwicklung in endotheliale Zellen wobei die Frage nach der Entstehung der ersten hämatopoetischen Zellen lange Zeit kontrovers diskutiert wurde. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese endothelial determinierten Vorläuferzellen sich direkt aus den Hämangioblasten entwickeln und zudem das Potenzial zur Abspaltung von Blutzellen besitzen. Dementsprechend werden sie als hämogene Endothelzellen bezeichnet (<sup>2</sup>Eilken *et al.*, 2009; <sup>3</sup>Lancrin *et al.*, 2009). In diesem als primitive embryonale Hämatopoese bezeichneten Prozess, entwickeln sich die ersten kernhaltigen Erythrozyten. Diese Blutzellen bilden zunächst sogenannte Blutinseln (engl. *blood islands*) auf der Oberfläche des Dottersacks und sind umgeben von endothelialen Zellen, die später zur Bildung des Gefäßsystems dienen. Sobald die erste Vaskularisierung im Embryo begonnen hat (etwa Tag E8.5 *p.c.*) können die primitiven Erythrozyten in die Zirkulation eintreten und erste Funktionen zum Sauerstofftransport innerhalb des Embryos und später des Fötus übernehmen. Nach Ausbildung der Vaskularisierung können auch myeloide und lymphoide Vorläuferzellen, sowie Blutzellen mit einer sogenannten Langzeit-Repopulierungs-Fähigkeit – Stammzellen, die die Fähigkeit haben, das Blutsystem über einen langen Zeitraum hinweg zu speisen – im extraembryonalen Dottersack gefunden werden. Die Frage nach der definitiven adulten Hämatopoese, also der Bildung der ersten HSZ, bleibt allerdings noch immer offen (<sup>4</sup>Samokhalov *et al.*, 2007), da aufgrund der bereits vorhandenen Vaskularisierung nicht endgültig geklärt werden kann, ob diese Zellen im Dottersack entstehen oder dort hin transportiert werden. Als weiterer Ort der definitiven adulten Hämatopoese kommt außer diesem extraembryonalen Gewebe eine intraembryonale Region in Frage, die sogenannte Aorten-Gonaden-Mesonephros (AGM) Region (<sup>5</sup>Taoudi *et al.*, 2005). Dieser Bereich umfasst die dorsale Aorta, das umgebende Mesenchym und die Urogenitalleiste.

Unabhängig vom Ursprungsort der adulten Hämatopoese migrieren die ersten HSZ zunächst in die fötale Leber, wo bis zur Geburt eine Weiterreifung und Expansion der HSZ erfolgt. Erst wenn das Knochenmark vollständig ausgebildet ist, erfolgt die Kolonialisierung mit

HSZ aus der fötalen Leber (Übersicht in <sup>6</sup>Mikkola und Orkin, 2006; <sup>7</sup>Huang *et al.*, 2007). Im adulten Organismus findet die Hämatopoese in Form von Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung von HSZ in spezialisierten Bereichen des Knochenmarks statt. Dies wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 2.2.2 Die Hämatopoese von HSZ

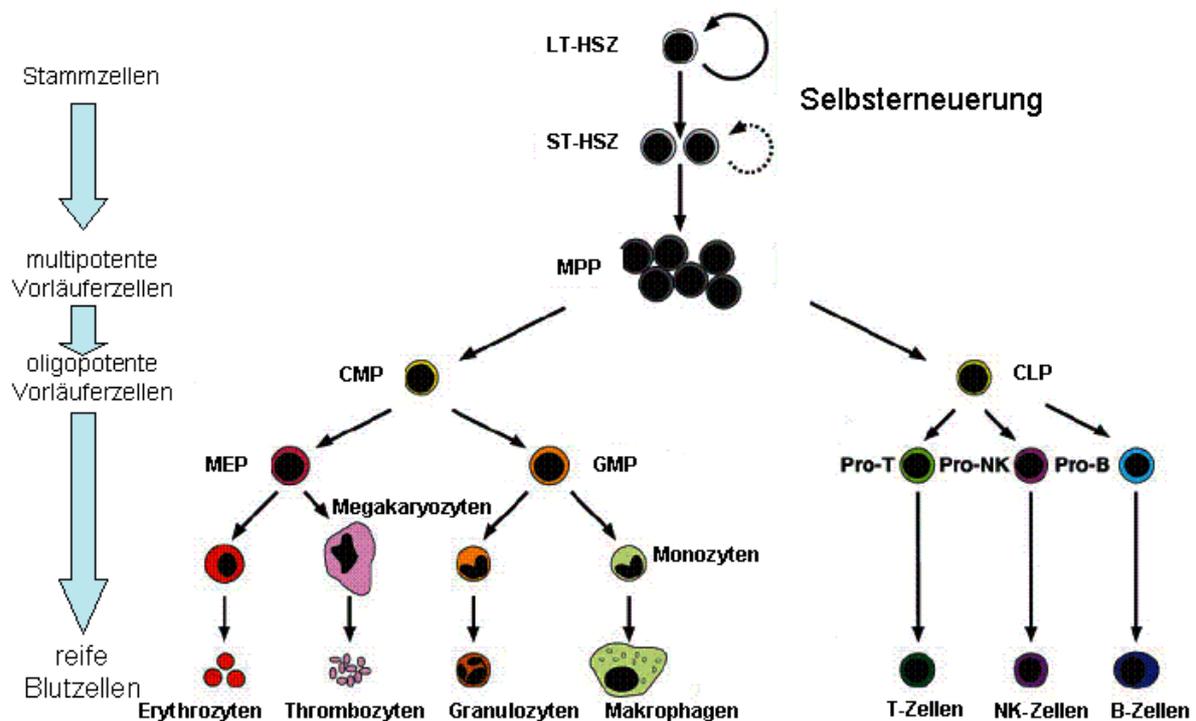
Damit hämatopoetische Stammzellen ein Leben lang erhalten bleiben, ist es wichtig, dass diese Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und eine nur niedrige Proliferationsfrequenz aufweisen, so lange kein außergewöhnlich hoher Bedarf an Blutzellen besteht. Im adulten Organismus liegen die HSZ in spezialisierten Bereichen des Knochenmarks (Nischen) vor, wovon zwei Bereiche in Betracht kommen: (1) eine Nische innerhalb der Bindegewebshaut (Endosteum), die den Knochen auskleidet und vom inneren Markbereich abgrenzt. Diese Schicht besteht vorwiegend aus sogenannten Osteoblasten - mesenchymale Zellen, die die Matrix für die spätere Knochenbildung durch Mineralisierung darstellen. (2) Eine Nische im Bereich der Blutkapillarwände (Sinusoide). Hier sind vor allem die Epithelzellen, die die Kapillarwände bilden, wichtig für die Anhaftung der HSZ (<sup>7</sup>Huang *et al.*, 2007).

In beiden Fällen ist es notwendig, dass die HSZ mit ihrer Umgebung interagieren können. Dies spielt sowohl zur Induktion der mitotischen Selbsterneuerung und für die Rückhaltung und den Schutz der HSZ eine Rolle, aber auch – wenn notwendig – zur Proliferation und Differenzierung bei Bedarf neuer Blutzellen in der Peripherie.

Der Rückhalt der HSZ in ihren spezialisierten Nischen wird vor allem durch die Interaktion zwischen Rezeptoren, die meist auf der Oberfläche von HSZ exprimiert werden und ihren Liganden, die von Zellen innerhalb der Nischen exprimiert und teilweise sezerniert werden, bewerkstelligt. In beiden Nischen gibt es eine Vielzahl von solchen Rezeptor/Liganden-Interaktionen, die diese Aufgabe erfüllen. Obwohl sich die Expression entsprechender Liganden durch die Zellen der Nischen in geringem Maße unterscheidet, scheint eine bestimmte Interaktion in beiden Nischen von großer Bedeutung zu sein: Die Interaktion zwischen dem *stromal derived factor 1* (SDF1 $\alpha$ , Cxcl12), der von sogenannten *Cxcl12-abundant reticular* (CAR) Zellen der Nischen gebildet und sezerniert wird, und dessen Rezeptor Cxcr4, der auf HSZ exprimiert wird (Übersicht in <sup>7</sup>Huang *et al.*, 2007). Beide Faktoren sind allerdings nicht nur für die Rückhaltung der HSZ im Knochenmark von Bedeutung: Während früher Entwicklungszeitpunkte bewirkt die SDF1 $\alpha$ -Produktion im Knochenmark die Migration der Cxcr4-exprimierenden HSZ aus der fötalen Leber zur Kolonialisierung des Knochenmarks und zu späteren Zeitpunkten kann ein SDF1 $\alpha$  Gradient im Organismus die Bereitstellung von HSZ zur weiteren Blutzellentwicklung bei Bedarf in der Peripherie bewirken (Übersicht in <sup>8</sup>Kucia *et al.*, 2005). Die Expression von Cxcr4 in/auf HSZs

stellt eine wichtige Stammzeleigenschaft dar und ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.

Die eigentliche Hämatopoese – Entwicklung aller Blutzelllinien aus HSZ – erfolgt in einem streng homöostatisch regulierten und schrittweisen Prozess. Im gesunden Organismus werden immer genauso viele Blutzellen nachgebildet, wie durch Apoptose oder Abbau in der Peripherie verloren gehen. Dieser Prozess wird reguliert durch das Zusammenspiel der Konzentration und Zelltyp-spezifischen Expression von Transkriptionsfaktoren mit extrazellulären Signalen, wie zum Beispiel Zell-Zell-Interaktion und Wachstumsfaktoren oder anderer Informations-übermittelnder Moleküle, die an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche von HSZ und Vorläuferzellen binden können. In Situationen wie zum Beispiel nach Verletzung, Infektion oder Blutverlust ist eine erhöhte und schnelle Bereitstellung neuer zellulärer Blutbestandteile erforderlich. Um dies zu gewährleisten, werden unter anderem von geschädigten Gewebezellen und an der Immunabwehr beteiligten Blutzellen verstärkt Wachstumsfaktoren und andere Informations-übermittelnde Faktoren exprimiert und sezerniert. Diese können über den Blutkreislauf bis hin zu den HSZ-Nischen im Knochenmark transportiert werden und eine verstärkte Proliferation und Differenzierung anregen. Der Prozess der Hämatopoese ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt und wird im Folgenden kurz erläutert.



**Abbildung 1: Schematische Übersicht des Prozesses der Hämatopoese.** Dargestellt ist die Entwicklung der im Text beschriebenen Blutzelllinien nach dem Akashi-Kondo-Weissman Modell. LT-HSZ, *long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSZ, *short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP, multipotente Progenitor; CMP, gesamte myeloide Vorläufer; CLP, gesamte lymphoide Vorläufer; Übernommen und modifiziert aus <sup>9</sup>Passegue *et al.*, 2003.

Zunächst entwickeln sich aus sogenannten *long term* (LT)-HSZ, *short term* (ST)-HSZ. Während LT-HSZ vor allem der Erhaltung des HSZ-Pools durch Selbsterneuerung über einen langen Zeitraum hinweg dienen, durchlaufen die ST-HSZ nur eine kurze Phase der Selbsterneuerung und entwickeln sich im Anschluss in etwas stärker determinierte, multipotente Vorläuferzellen oder sterben durch Apoptose ab. Multipotente Vorläuferzellen haben noch ein gewisses Potenzial zur Selbsterneuerung, dienen aber vor allem zur weiteren Entwicklung in Linien-spezifische gesamte myeloide Vorläuferzellen (engl. *common myeloid progenitors*, CMP) oder gesamte lymphoide Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitors*, CLP). Diese Vorläuferzellen können sich nicht mehr selbst erneuern und bilden aufgrund irreversibler Reifungsschritte, die vor allem durch die Aktivität und Konzentration Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren determiniert sind, nur noch Zellen der entsprechenden myeloiden oder lymphoiden Reihe.

Ob die CLPs in B- oder T-Lymphozyten weiterreifen entscheidet sich durch den Verbleib der Vorläuferzellen im Knochenmark oder deren Migration in den Thymus. Während ersteres zunächst zur weiteren Differenzierung von B-Lymphozyten führt, die noch vor ihrer vollständigen Ausreifung aus dem Knochenmark vor allem in die sekundären lymphatischen

Organe Milz und Lymphknoten migrieren, werden T-Lymphozyten ausschließlich im Thymus aus dort eingewanderten CLPs gebildet. Die Reifung von NK-Zellen aus CLPs erfolgt im Knochenmark.

Die Weiterentwicklung von CMPs erfolgt ausschließlich im Knochenmark. CMPs können zunächst entweder in megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzellen (engl. *megakaryocytic erythroid progenitors*, MEP) oder granulozytäre/monozytäre Vorläuferzellen (engl. *granulocytic monocytic progenitors*, GMP) differenzieren. Die MEPs entwickeln sich weiter in Erythrozyten und Megakaryozyten, die durch Zerfall zu Thrombozyten werden. GMPs reifen weiter in Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (Übersicht in <sup>9</sup>Passuege *et al.*, 2003; <sup>133</sup>Graf und Trumpp, online Poster, Nature Reviews).

Der hier vereinfacht dargestellte Prozess der Hämatopoese entspricht dem sogenannten Akashi-Kondo-Weissman Schema. Dieser Ablauf postuliert einen mehr oder weniger streng binär ablaufenden Prozess, was bedeutet, dass jede Vorläuferzelle die Möglichkeit hat, in zwei verschiedene Nachfolgezellen zu reifen. Ob die Hämatopoese allerdings tatsächlich diesem Schema folgt, wird aufgrund mehrerer Studien der letzten Jahre etwas kontrovers diskutiert (Übersicht in <sup>10</sup>Laiosa *et al.*, 2006).

Auf zellulärer Ebene spielt wie bereits erwähnt vor allem die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren eine große Rolle für die Spezifizierung von HSZ. Der wohl naheliegendste Grund hierfür ist, dass die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ein spezifisches genetisches Programm aktiviert, was gleichzeitig durch unterschiedliche Mechanismen zur Repression eines gegensätzlichen Programms führen kann. Während dieser ersten Entwicklungsschritte können so zunächst die myeloïden oder lymphoïden Vorläuferzellen aus HSZ und multipotenten Vorläuferzellen entwickelt werden. Dabei verändert sich auch die Expression von speziellen Oberflächenproteinen auf diesen Zellen, was eine wichtige Rolle für deren Reaktionsvermögen auf äußere Stimuli spielt.

Da für diese Arbeit vor allem die Differenzierung myeloïder Zellen – speziell der GMPs in Monozyten/Makrophagen oder Granulozyten – von besonderer Bedeutung ist, wird diese im folgenden Abschnitt unter Berücksichtigung der beteiligten Transkriptionsfaktoren, sowie extrazellulären Stiumuli und dadurch aktivierte Signalkaskaden genauer beschrieben.

### **2.3 Die Entwicklung myeloïder Zelllinien**

Zur Spezifizierung, Weiterentwicklung und endgültigen Ausreifung myeloïder Zellen sind zunächst die zelltyp-spezifische Expression und Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren von Bedeutung. Durch deren Zusammenspiel kann auf DNA-Ebene ein genetisches Programm aktiviert werden, dass die Entwicklung der myeloïden Zellen zur Folge hat und gleichzeitig werden genetische Programme, die die Entwicklung anderer Zelllinien induzieren, deaktiviert. Diese antagonistischen Funktionen können auf unterschiedlichen Ebenen reguliert

werden, worauf später noch eingegangen wird. Zunächst sollen die wichtigsten Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit myeloider Entwicklung kurz vorgestellt werden.

### 2.3.1 Wichtige myeloide Transkriptionsfaktoren

Während sehr früher Differenzierungsprozesse ist der Transkriptionsfaktor Runx1 (*core binding factor  $\alpha 2$*  (CBF $\alpha 2$ ); Aml1), der zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit Homologie zu Faktoren mit Runt-Domäne von *Drosophila melanogaster* gehört, von besonderer Bedeutung. Runx1 ist eine von drei  $\alpha$ -Untereinheiten, die mit CBF $\beta$  den aktiven CBF-Komplex bilden können. In diesem Heterodimer vermittelt die Runt-Domäne von Runx1 die DNA Bindung an Promotor/Enhancer Sequenzen entsprechender Zielgene. Speziell in der sehr frühen embryonalen hämatopoetischen Entwicklung ist die Aktivität von Runx1 wichtig zur Bildung hämatopoetischer Zellen aus endothelialen Vorläufern (<sup>11</sup>Chen *et al.*, 2009). Zu späteren Zeitpunkten reguliert Runx1 die Entwicklung von CLPs, B- und T-lymphoiden Zellen, aber – im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren – auch die Expression myeloider Gene. Hierzu gehören zum Beispiel die Gene der Rezeptoren für wichtige myeloide Wachstumsfaktoren wie den Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und des Monozyten-CSF (M-CSF) (Übersicht in <sup>12</sup>Friedman, 2002; <sup>13</sup>Rosmarin *et al.*, 2005; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

Zwei der wohl wichtigsten Transkriptionsfaktoren während der myeloiden Entwicklung sind Pu.1 und C/ebp $\alpha$  (*CCAAT enhancer binding protein*). Pu.1 gehört zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und ist das Produkt des Onkogens *Sfpi1* (murines Gen; humanes Gen: *SP11*). Über die C-terminal gelegene Ets-Domäne erfolgt mit Hilfe eines Helix-turn-Helix Motives die Bindung an regulatorische DNA-Sequenzen. Weiterhin wird durch diese Domäne auch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. N-terminal enthält das Protein eine Transaktivierungsdomäne, gefolgt von einer sogenannten PEST-Domäne, die vor allem aus den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin aufgebaut ist. Auch über diese Domänen kann Protein-Protein-Interaktion vermittelt werden. Pu.1 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist unabdingbar zur Entwicklung von B-lymphoiden Zellen und Makrophagen. Die Bedeutung von Pu.1 für die myeloide Entwicklung wird besonders deutlich aufgrund der Tatsache, dass fast alle myeloid-spezifischen Gene eine Pu.1 Bindungssequenz in entsprechenden regulatorischen Regionen aufweisen. Als Beispiele seien hier die Gene der myeloiden Oberflächenproteine CD11b und CD18, sowie die Gene für die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren GM-CSF, Granulozyten-CSF (G-CSF) und M-CSF aufgeführt. Auch das *Sfpi1*-Gen selbst wird autoregulatorisch durch Pu.1 aktiviert (Übersicht in <sup>13</sup>Rosmarin *et al.*, 2005). Ein knock-out der *Sfpi1*-Allele in Keimzellen führt zum Ausfall der reifen myeloiden und B-lymphoiden Zellen, ein konditionaler knock-out in adulten HSZ führt zu einer Erhöhung der Zahl an unreifen Granulozyten, sowie der Ausbildung von erythroiden

Vorläuferzellen (Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

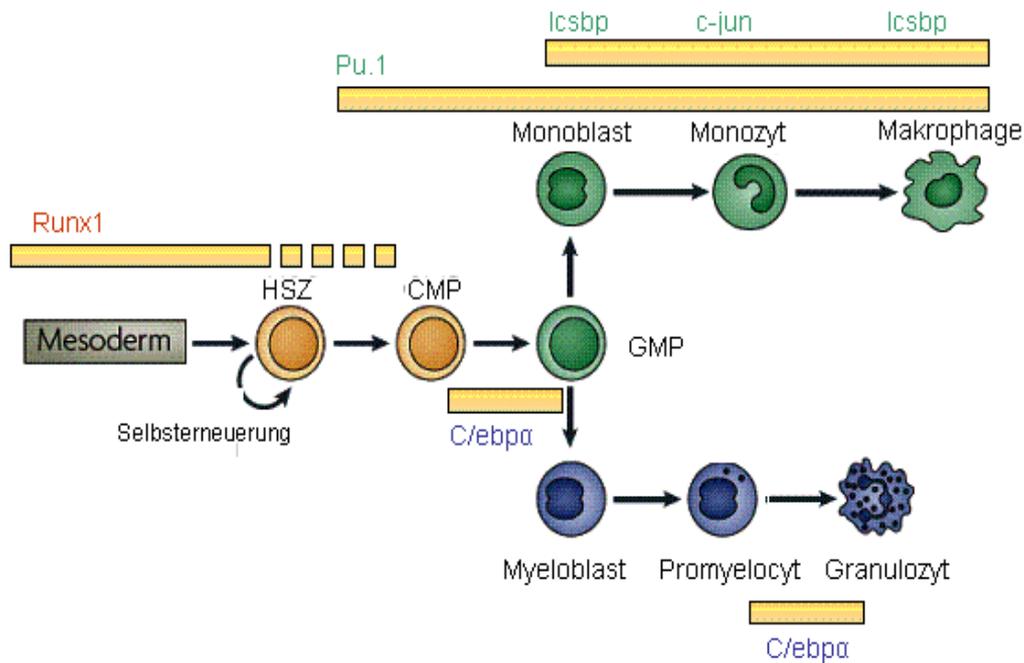
Während der einzelnen Entwicklungsschritte, in denen Pu.1 von Bedeutung ist, spielt vor allem dessen Konzentration eine große Rolle. Eine hohe Konzentration in HSZ führt zunächst zur Entwicklung von CMPs, während geringere Konzentrationen zur Ausbildung von CLPs notwendig sind. Zu späteren Entwicklungszeitpunkten bewirkt eine hohe Pu.1 Konzentration die Entwicklung von GMPs in Monozyten/Makrophagen auf Kosten von Granulozyten, während zur vollständigen Granulozyten-Ausreifung ein niedriger Pu.1 Level ausreicht (Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

Der zweite wichtige myeloide Transkriptionsfaktor – C/ebp $\alpha$  – ist der erstgefundene Faktor der C/ebp-Familie. Diese Transkriptionsfaktoren weisen N-terminal Transaktivierungsdomänen zur Protein-Protein-Interaktion auf, gefolgt von basischen DNA-Bindedomänen. C-terminal liegt eine basische Leuzin-Zipper-Domäne, wodurch ebenfalls die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt wird. C/ebp $\alpha$  wird im hämatopoetischen System vor allem in HSZ, myeloiden Vorläufern und Granulozyten exprimiert, aber auch in nicht-hämatopoetischen Geweben wie zum Beispiel der Leber und in Fettzellen. Einige wichtige Zielgene von C/ebp $\alpha$  im Zusammenhang mit myeloider Entwicklung sind das G-CSF-Rezeptor-Gen, das Interleukin 6 (IL6)-Rezeptor-Gen, *Sfp1* (codiert für PU.1), sowie *Cebpa* selbst (Übersicht in <sup>13</sup>Rosmarin *et al.*, 2005; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

Wie beschrieben ist die Expression von Pu.1 wichtig für die Bildung von CMPs aus HSZs, während C/ebp $\alpha$  die weitere Differenzierung von CMPs in GMPs bewirkt. Steigt die C/ebp $\alpha$  Konzentration während der folgenden Entwicklungsschritte, so kommt es zur Induktion granulozytärer Differenzierungsprozesse auf Kosten von Monozyten/Makrophagen. Speziell Makrophagen exprimieren kein C/ebp $\alpha$  mehr (Übersicht in <sup>13</sup>Rosmarin *et al.*, 2005; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Sind beide *Cebpa*-Allele in murinen Keimzellen ausgeschaltet, so kann ein Anstieg unreifer myeloider Zellformen, sowie die fehlende Entwicklung von GMPs und Granulozyten und eine verlangsamte Entwicklung von Monozyten beobachtet werden (Übersicht in <sup>12</sup>Friedman, 2002; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit der C/ebp $\alpha$ -induzierten Ausdifferenzierung von Granulozyten ist die Regulation von Zell-Zyklus-assoziierten Genen und Proteinen durch diesen Faktor. So reprimiert C/ebp $\alpha$  zum Beispiel die Aktivität von E2F was zu einer verminderten Phosphorylierung des Retinoblastoma (Rb) Proteins führt und in einem Zell-Zyklus-Arrest resultiert (<sup>15</sup>Porse *et al.*, 2001).

Eine Übersicht der Expression der hier besprochenen Transkriptionsfaktoren während einzelner Entwicklungsstadien ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2: Übersicht über die Expression wichtiger myeloider Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten während der myeloiden Differenzierung.** Übernommen und modifiziert aus <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007.

### 2.3.2 Wie wird die zelltyp-spezifische Expression und Konzentration dieser Transkriptionsfaktoren gesteuert?

Um eine fehlerfreie myeloide Entwicklung zu gewährleisten, spielt zunächst die zelltyp-spezifische Expression und Konzentration der an diesem Prozess beteiligten Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. Dazu ist die streng kontrollierte Expression und Aktivität dieser Faktoren von entscheidender Bedeutung. Dies wird auf verschiedenen Ebenen reguliert und wird im Folgenden kurz beschrieben.

#### 1. Regulation auf Transkriptionsebene:

Zur Zelltyp-spezifischen Expression von Transkriptionsfaktor-codierenden Genen ist die Aktivität von (zusätzlichen) Transkriptionsfaktoren auf *Cis*-regulatorischen DNA-Sequenzen notwendig. Diese Art der Regulation ist bisher nur für das *Sfpi1/SPI1*-Gen (codiert für Pu.1/PU.1) detaillierter untersucht. Im 5'Bereich des *Sfpi1/SPI1*-Lokus können drei Gruppen möglicher *Cis*-regulatorischer Elemente, zusätzlich zum *Sfpi1/SPI1*-Promotor, gefunden werden (<sup>16</sup>Li *et al.*, 2001). Die Mutation eines dieser Elemente im murinen Modell führte zur Verminderung der Pu.1 Expression auf 20% der normalen Konzentration in HSZ, myeloiden Vorläuferzellen und B-lymphoiden Zellen, aber einer Erhöhung der Pu.1 Konzentration in

T-lymphoiden Vorläuferzellen. Die Folge dieser Zelltyp-spezifischen Expressionsänderung von Pu.1 ist eine stark verminderte myeloide und T-Zell-Differenzierung, was eine myeloische Leukämie beziehungsweise die Ausbildung von Lymphomen zur Folge hatte (Rosenbauer *et al.*, <sup>17</sup>2004 und <sup>18</sup>2006). Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass die Expression und Konzentration der myeloiden Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Zelltypen bereits durch Regulation auf DNA-Ebene unter anderem durch das Ausnutzen unterschiedlicher regulatorischer DNA-Sequenzelemente zustande kommen kann.

## 2. Regulation auf Translationsebene

Auch nach Expression der entsprechenden Gene kann die endgültige Bildung des aktiven Proteins noch moduliert werden. Als Beispiel soll hier die Expression von C/ebp $\alpha$  aufgeführt werden. Ein und dieselbe mRNA kann zur Expression zweier verschiedener Formen von C/ebp $\alpha$  führen. Im 5'UTR-Bereich dieser mRNA finden sich regulatorische Sequenzen zur Bindung der eukaryotischen Translationsfaktoren EIF4E und EIF2 (*eukaryotic initiation factors*). Je nach Konzentration dieser Faktoren wird ein AUG-Startcodon zur Expression des volle Länge C/ebp $\alpha$  Proteins (42 kDa) oder aber ein AUG-Codon zur Expression einer kürzeren 30 kDa-Form verwendet (<sup>19</sup>Calkhoven *et al.*, 2000). Während das volle Länge Protein vollständig transkriptionell aktiv und wichtig für die Ausdifferenzierung von Granulozyten ist, wirkt die kürzere 30 kDa-Form von C/EBP $\alpha$  mit fehlender N-terminaler Domäne als dominant-negatives Suppressor-Protein, das die Aktivität der 42 kDa-C/EBP $\alpha$  Form unterbinden kann (<sup>20</sup>Pabst *et al.*, 2001). Dies gilt für das humane System sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*. In murinen Vorläuferzellen führt die Expression der 30 kDa-C/ebp $\alpha$  Form zwar nicht zu einem myeloiden Differenzierungsblock (<sup>21</sup>Schwieger *et al.*, 2004), aber zu einer verstärkten Proliferation myeloider Vorläuferzellen (<sup>22</sup>Porse *et al.*, 2005).

## 3. Regulation durch Protein-Protein-Interaktion

Eine besonders wichtige Rolle für den fehlerfreien Ablauf eines genetischen Differenzierungsprogrammes spielt die Interaktion zwischen regulatorischen Proteinen. Diese Interaktion kann sich sowohl aktivierend, als auch hemmend auf die Transkription der Zielgene auswirken und kann zudem wichtig für die Transkription *per se* sein. Für diese Aspekte gibt es zahlreiche Beispiele, von denen im Folgenden aus Gründen der Übersicht nur die für die myeloide Differenzierung wichtigsten kurz erläutert werden.

Während der frühen Entwicklungsprozesse multipotenter Vorläuferzellen ist die Interaktion von Pu.1 mit dem basischen Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktor Gata1 von großer Bedeutung. Gata1 ist ein wichtiger Faktor zur Spezifizierung der megakaryozytären/erythroiden Linie und damit ein Gegenspieler von Pu.1 in Bezug auf die Induktion der myeloiden Differenzierung. Beide Transkriptionsfaktoren können in einer

hemmenden Weise miteinander interagieren, wobei die Konzentration der jeweiligen Faktoren eine Rolle spielt: Pu.1 ist in der Lage die DNA-Bindungs Kapazität von Gata1 zu inhibieren oder – durch Interaktion mit bereits DNA-gebundenem Gata1 – weitere Co-Faktoren zu rekrutieren, wodurch ein Repressorkomplex gebildet wird (<sup>23</sup>Stopka *et al.*, 2005; Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Liegt Gata1 in hoher Konzentration vor, so wird die Pu.1-Aktivität auf den Promotoren wichtiger myeloider/monozytärer Gene vermindert. Dies erfolgt zum Beispiel durch Bindung von Gata1 an die  $\beta 3/\beta 4$  Domäne innerhalb des Ets-Motivs von Pu.1, wodurch dessen Interaktion mit einem weiteren wichtigen Co-Faktor – c-jun – geblockt wird. Die Aktivierung monozytärer Gene durch den Pu.1/c-jun Komplex kann durch eine weitere mögliche Interaktion – c-jun und C/ebp $\alpha$  – gehemmt werden. Dies führt zu einer verstärkten Granulopoese (<sup>24</sup>Rangatia *et al.*, 2002).

In Bezug auf die Differenzierung von GMPs in Granulozyten oder Monozyten/Makrophagen ist weiterhin die Interaktion zwischen Pu.1 und Icsbp (*Interferon consensus sequence binding protein*; auch Irf8 (*Interferon response factor 8*)) von Bedeutung. Dieser Komplex scheint vor allem für die Ausreifung und Aktivität von Makrophagen und dementsprechend auf den Promotoren von Makrophagen-spezifischen Genen notwendig zu sein (Tamura *et al.*, <sup>25</sup>2000 und <sup>26</sup>2005). Icsbp alleine moduliert ebenfalls die Expression monozytärer Gene wie das des M-CSF-Rezeptors, während zum Beispiel die Expression des G-CSF-Rezeptor-Gens durch die Icsbp Aktivität vermindert wird (<sup>25</sup>Tamura *et al.*, 2000).

Die meisten der hier aufgeführten Transkriptionsfaktoren können zusätzlich Interaktionen mit sogenannten Co-Aktivator oder -Repressor Proteinen eingehen. Diese Moleküle weisen in der Regel eine enzymatische Funktion auf, die entweder die DNA direkt, oder aber die Chromatinstruktur durch Modifizierung der mit der DNA assoziierten Histone verändert. In diesem Zusammenhang sollen kurz die sogenannten Histon-Acetylasen (HATs) und deren Gegenspieler, Histon-Deacetylasen (HDACs) vorgestellt werden. Durch Assoziation von Transkriptionsfaktoren mit HATs kommt es zunächst zur Acetylierung von Lysinresten innerhalb der Histone. Dadurch wird deren positive Ladung maskiert und die Bindung an das negativ geladene Rückgrat der DNA vermindert, was zur Auflockerung der Chromatinstruktur führt. Im umgekehrten Falle, der Assoziation von Transkriptionsfaktoren mit HDACs wird diese Reaktion rückgängig gemacht, so dass die wieder positiv geladenen Lysine innerhalb der Histone wieder stärker mit der DNA interagieren können und die Chromatinstruktur weniger zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie ist (Übersicht in <sup>27</sup>Haberland *et al.*, 2009). Einige HATs können aber auch zu einer direkten Acetylierung der Transkriptionsfaktoren selbst führen, was eine veränderte DNA-Bindung oder Interaktion mit weiteren Proteinen zur Folge hat. Für Runx1, Pu.1 und C/ebp $\alpha$  ist die Interaktion mit der HAT p300 gezeigt (Übersicht in <sup>13</sup>Rosmarin *et al.*, 2005). Da dieses Protein mit Hilfe unterschiedlicher Domänen an mehrere Proteine gleichzeitig binden kann, ist die Bildung

eines großen Transkriptionsfaktor-Komplexes möglich.

#### 4. Einfluss äußerer Stimuli

Ein nicht zu vernachlässigender Einfluss auf hämatopoetische Entwicklungsprozesse üben äußere Faktoren aus. Während der gesunden Hämatopoese spielen vor allem Faktoren, die von den Zellen der hämatopoetischen Nischen sezerniert werden, aber auch die Zell-Zell-Interaktionen als solche, eine wichtige Rolle (Übersicht in <sup>28</sup>Enver *et al.*, 1998; <sup>29</sup>Metcalf *et al.*, 1998). Während außergewöhnlicher Situationen, wie zum Beispiel nach Eindringen körperfremder Stoffe in den Organismus, muss das hämatopoetische System in der Lage sein, sich sehr schnell an diese veränderte Situation anzupassen. Hier erfolgt die Informationsübermittlung mit Hilfe von Faktoren, die zum Beispiel von an der Immunabwehr beteiligten Blutzellen wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten gebildet werden und über den Blutkreislauf bis hin zu den hämatopoetischen Nischen transportiert werden (Übersicht in <sup>30</sup>Nathan, 2002).

In beiden Situationen sind eine Vielzahl an Molekülen für die Hämatopoese von Bedeutung. Während des myeloiden Differenzierungsprozesses spielen neben den bereits erwähnten Wachstumsfaktoren GM-CSF, G-CSF und M-CSF, die Interleukine 3 und 6 eine wichtige Rolle. Die Bindung dieser Moleküle an entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt in der Regel zur Aktivierung oder Repression eines Sets exprimierter Transkriptionsfaktoren, was meist verstärkte Proliferation und positive Selektion einer entsprechenden Zelllinie zur Folge hat (<sup>28</sup>Enver *et al.*, 1998).

Die genauen Signalwege, die nach Aktivierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche myeloider Zellen ablaufen sind bisher nur unvollständig aufgeklärt (Übersicht in <sup>31</sup>Miranda und Johnson, 2007). Ein wichtiger Signalweg, für den eine direkte Assoziation mit Transkriptionsfaktoren der myeloiden Differenzierung gezeigt ist, läuft über die Kinasen Ras, Raf, Mek-1,2 und Erk-1,2. Diese Kette an Phosphorylierungen bewirkt letztendlich eine Phosphorylierung von zum Beispiel Pu.1, C/ebp $\alpha$  und Runx1 mit unterschiedlichen Auswirkungen. Während Pu.1 durch diese Modifikation stärker an entsprechende regulatorische DNA-Sequenzen binden kann (<sup>32</sup>Miranda *et al.*, 2005) und Runx1 eine verstärkte Transaktivierungskapazität aufweist (<sup>33</sup>Tanaka *et al.*, 1996), kommt es durch Phosphorylierung von C/ebp $\alpha$  zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität (<sup>34</sup>Ross *et al.*, 2004). Auch in diesem Szenario wird die mögliche Gegenspieler-Funktion von Pu.1 und C/ebp $\alpha$  bei der Entwicklung von Monozyten/Makrophagen oder Granulozyten aus GMPs unterstützt. Weiterhin bewirkt die Ras/Raf/Mek/Erk-Signalkaskade eine Phosphorylierung von Stat-Proteinen, wodurch die Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL hochreguliert wird und damit das Überleben der Zellen unterstützt wird (<sup>35</sup>Miranda *et al.*, 2003).

Die meisten Signalwege stehen über bestimmte Proteine innerhalb der Signalketten

miteinander in Verbindung. Somit kann wohl keine der Kaskaden nur einzeln betrachtet werden, vielmehr führt die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege aufgrund der Bindung äußerer Faktoren an entsprechende Rezeptoren zu einer Integration einer großen Anzahl an Information. Am Ende der Kaskaden steht dann die Zelltyp-spezifische Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, die zur Aktivierung und Repression entsprechender genetischer Programme führen.

Alle bisher beschriebenen Prozesse laufen streng kontrolliert und aufeinander abgestimmt ab. Eine Fehlregulation hat dementsprechend meist ernsthafte Folgen. Hierzu kann die Entwicklung einer der schwerwiegendsten Erkrankungen des Blutsystems – die Leukämie – gehören, worauf im anschließenden Abschnitt genauer eingegangen werden soll.

## **2.4 Leukämie**

Mutationen, die den Ablauf genetischer Programme während der Hämatopoese beeinflussen, können zum Verlust der strengen Kontrolle der Blutbildung führen. Eine solche maligne Entartung von zumeist Leukozyten kann in einer Form von Krebs – der Leukämie – resultieren. Je nachdem, welche Blutlinie von der Entartung betroffen ist, unterscheidet man zwischen lymphatischen oder myeloischen Leukämien.

Als chronische Leukämien bezeichnet man Erkrankungen, in denen zunächst trotz verstärkter (klonaler) Proliferation von Vorläuferzellen im Knochenmark noch ausgereifte Blutzellen gebildet werden können. Dies kann mehr oder weniger unbemerkt über Jahre hinweg erfolgen, bis irgendwann die sogenannte akute Phase eintritt. Die Zellen beginnen dann sehr schnell und stark zu proliferieren und reifen nicht mehr aus (Differenzierungsblock). Dies endet schließlich in einer sogenannten Blasten-Krise, die durch starke Akkumulation der unreifen Vorläuferzellen (Blasten) zunächst im Knochenmark und nachfolgend im Blut und weiteren Organen gekennzeichnet ist.

Im Falle der akuten Leukämien kommt es meist zu einem spontanen Auftreten der Erkrankung, die dann bereits mit einer starken Proliferation und Akkumulation unreifer Vorläuferzellen beginnt. Diese leukämischen Zellen verdrängen zunächst die normale Blutbildung im Knochenmark und breiten sich im Anschluss über das Blut im Organismus aus. Meist sind zunächst lymphatische Organe wie die Milz und Lymphknoten, aber auch nicht-hämatopoetische Organe, wie zum Beispiel die Leber, von einer Invasion leukämischer Zellen betroffen. Dies ist vor allem durch das teilweise schmerzhafte Anschwellen dieser Organe gekennzeichnet. Aufgrund der Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark kommt es zu einer Verminderung an Erythrozyten und Thrombozyten, was mit Schwäche aufgrund verminderter Sauerstoffversorgung und erhöhter Blutungsneigung einhergeht. Die verminderte Anzahl an funktionsfähigen Leukozyten bewirkt zudem eine erhöhte

Infektionsanfälligkeit der Betroffenen. Da der Organismus so nicht mehr in der Lage ist, mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden und zudem keine intakte Immunabwehr mehr besitzt, führt eine unbehandelte akute Leukämie, sowie eine chronische Leukämie in der akuten Phase unweigerlich zum Tod.

Die bei Kindern dominierende Form der Leukämie ist die akute lymphatische Leukämie (ALL), während die akute und chronische myeloische Leukämie (AML und CML) häufiger bei Erwachsenen auftritt. Ab dem mittleren Lebensalter kommt es zu einem verstärkten Auftreten der chronischen lymphatischen Leukämien (CLL), die dann auch bei älteren Menschen die vorherrschende Form der Leukämie ist (<sup>36</sup>Überblick aus Kompetenznetz Leukämien: Leukämien in Deutschland).

Da für diese Arbeit vor allem die AML von Bedeutung ist, wird im Folgenden genauer auf die unterschiedlichen Formen und möglichen Ursachen dieser Erkrankung eingegangen.

#### **2.4.1 Akute myeloische Leukämie (AML)**

Die akute myeloische Leukämie ist die bei Erwachsenen zwischen dem 20. bis 50. Lebensjahr am häufigsten auftretende Form der akuten Leukämie (<sup>36</sup>nach Kompetenznetz Leukämien: Leukämien in Deutschland, Stand 2003). Sie ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation und Expansion von malignen, myeloid determinierten (Vorläufer)Zellen im Knochenmark, Blut und anderen Geweben. Bereits 1976 wurde ein Klassifizierungsschema, basierend auf dem Differenzierungsstatus der transformierten Zellen von einer Gruppe von Wissenschaftlern um C. Sultan vorgeschlagen. Hierzu wurden Daten von Patienten von insgesamt 7 Hämatologen aus Frankreich, den USA und Großbritannien (*French-American-Britain*; FAB) gesammelt und deren Status der Blutzellentartung beziehungsweise noch vorhandener Differenzierungskapazität nach morphologischen und zytologischen Kriterien kategorisiert (<sup>37</sup>Bennett *et al.*, 1976). Diese sogenannte FAB-Klassifizierung wird auch heute noch zur Beschreibung von Subtypen der AML verwendet. Aufgrund der Fortschritte innerhalb der letzten Jahre, Veränderungen auf DNA-Ebene identifizieren zu können, konnten weitere Klassifizierungs-Schemata etabliert werden. In diesen steht nicht mehr der morphologische Phänotyp der entarteten Zellen, sondern die Identifikation von Mutationen in den entarteten Zellen im Vordergrund (Übersicht in <sup>38</sup>Tenen, 2003; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Für die vorliegende Arbeit ist sowohl die FAB-Klassifizierung der AML, als auch das Vorkommen von Veränderungen, die vor allem Transkriptionsfaktorgene betreffen, von Bedeutung. Aus diesem Grund ist in Tabelle 1 eine vereinfachte Übersicht beider Kriterien zusammengefasst. Aus dieser ergibt sich, dass bestimmte Transkriptionsfaktor-Mutationen häufig in Verbindung mit einem Differenzierungsblock zu bestimmten Zeitpunkten der myeloiden Blutzellentwicklung stehen.

Das tatsächliche Auftreten veränderter Transkriptionsfaktoren konnte zunächst durch

Identifizierung von Fusionen von Teilen verschiedener Transkriptionsfaktoren in humanen AML-Proben bestätigt werden. Diese Fusionsproteine sind die Folge von somatischen Translokationsereignissen, bei denen durch Austausch von bestimmten Chromosomenabschnitten ein Fusionsgen entsteht. Mit Hilfe von Mausmodellen konnte das onkogene Potenzial vieler solcher Fusionsgene beziehungsweise dessen Produkten bestätigt werden. Die häufigsten in AML gefundenen Fusionsproteine sind RUNX1/ETO (*Eleven Twenty One*), das Produkt der Translokation zwischen dem *RUNX1* Locus auf Chromosom 8 und dem *ETO* Locus auf Chromosom 21 (t(8;21)). Desweiteren das Fusionsprotein aus den Transkriptionsfaktoren *Promyelocytic Leukemia/Retinoid Acid Receptor α* (PML/RARα; t(15;17)), Fusionsproteine mit Beteiligung des *Mixed Lineage Leukemia* (MLL; t11q23) Transkriptionsfaktors oder auch eine Inversion auf Chromosom 16 (Inv16), die zur Bildung des *Core Binding Factor β/Myosin, Heavy Polypeptide 11* (CBFβ/MYH11) führt (Übersicht in <sup>39</sup>Rosenbauer *et al.*, 2005).

Zunächst erscheint mit RUNX1 hier nur einer der in dieser Arbeit für die myeloide Entwicklung als sehr wichtig aufgeführten Transkriptionsfaktoren das Ziel von Mutationsereignissen zu sein, die zur Entwicklung von AML führen können. Die Bedeutung weiterer Faktoren wie zum Beispiel PU.1, C/EBPα und ICSBP als Ursache für den auftretenden Differenzierungsblock wird aber durch die häufig verminderte Konzentrationen dieser Faktoren in AML-Proben deutlich. In 7 bis 11% der AML Patienten können zudem auch direkte Mutationen zum Beispiel innerhalb der Gene *RUNX1* und *CEBPA* gefunden werden (Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Für *SPI1* (codiert PU.1) ist das Auftreten von direkten Mutationen umstritten, da diese lediglich in einer Studie mit 126 AML-Patienten nachgewiesen werden konnten (<sup>40</sup>Mueller *et al.*, 2002). Kommen direkte Mutationen vor, so handelt es sich vor allem um Punktmutationen oder kleine Deletionen und Insertionen. Diese liegen häufig in den codierenden Abschnitten der entsprechenden Gene, so dass Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, die in ihrer Funktion verändert sind. In 58% der AML-Fälle mit *CEBPA*-Mutation kommt es zur Expression der dominant-negativen 30 kDa Form des Proteins. Weitere Mutationen betreffen den C-Terminus des Proteins, so dass keine DNA-Bindung mehr erfolgen kann (<sup>20</sup>Pabst *et al.*, 2001). Die in der Studie von Mueller *et al.* gefundenen Mutationen des *SPI1* Gens resultieren am häufigsten in der Expression einer Form von PU.1, die nur noch in geringem Maße mit RUNX1 oder C-JUN interagieren kann. Allgemein treten alle diese Mutationen als heterozygote Veränderung auf, so dass zusätzlich auch eine Verminderung der Konzentration der aktiven Form des Faktors die Folge ist (Übersicht in <sup>39</sup>Rosenbauer *et al.*, 2005 und <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

**Tabelle 1: AML-Klassifizierung nach FAB-System.** Die zu bestimmten Differenzierungszeitpunkten häufig auftretenden Mutationen sind zusätzlich eingefügt. Zusammengefasst nach <sup>38</sup>Tenen 2003

FAB Subtyp	Differenzierungsstatus	Beschreibung
M0	Undifferenziert	positiv für myeloide Marker, außer Myeloperoxidase  häufig biallelische Mutationen in <u>RUNX1</u> und/oder <u>SPI1</u>
M1	Myeloblasten ohne Differenzierung	Teilweise granulozytäre Differenzierungsansätze  teilweise Mutationen von <u>CEBPA</u> , Expression der N-terminalen, dominant-negativen Mutante, nicht in Verbindung mit t(8;21)
M2	Myeloblasten mit Differenzierung	Reifung bis etwa promyelozytärem Stadium  wird unterschieden in Leukämien mit und ohne <u>RUNX1/ETO</u> t(8;21)  ohne t(8;21) teilweise Mutationen von <u>CEBPA</u>
M3	Promyeloblastisch	Akute promyeloblastische Leukämie (APL)  teilweise mit PML/RAR $\alpha$ (t(15;17)) oder anderer Translokation, die RAR $\alpha$ betrifft  <u>CEBPA</u> Mutationen mit Verlust der DNA-Bindungskapazität
M4	Myelomonozytär	Selten <u>SPI1</u> und <u>CEBPA</u> Mutationen  nicht in Kombination mit Translokationen und Inv16
M4 Eo	Myelomonozytär mit Eosinophilie im Knochenmark	Häufig Inv16
M5	Monozytär	Selten <u>SPI1</u> Mutation
M6	Erythroleukämie	Selten <u>SPI1</u> Mutation
M7	Megakaryoblastisch	Immer <u>GATA1</u> Mutation wenn Leukämie in Verbindung mit Down Syndrom auftritt

### 2.4.2 Die leukämische Stammzelle (LSZ)

Wodurch kommt es zu einer Akkumulation entarteter Zellen? Diese Frage beschäftigt nicht nur Hämatologen, sondern spielt in der Onkologie allgemein eine große Rolle. Sind alle entarteten Zellen eines Tumors oder einer Leukämie in der Lage sich durch unkontrollierte Proliferation zu vermehren? Oder sind es nur einige wenige, sogenannte „Tumorstammzellen“, die das Potenzial zur unkontrollierten Proliferation besitzen und dadurch den Tumor immer wieder speisen können? Für diese Theorie sprechen vor allem Studien aus den letzten Jahren. So konnte beispielsweise 2004 die Gruppe um John E. Dick zeigen, dass innerhalb eines Pools an humanen AML-Zellen Stammzellen zu finden sind, die – wie normale HSZ – eine gewisse Hierarchie in ihrem Differenzierungspotenzial aufweisen. Durch serielle Transplantationsstudien mit immundefizienten NOD/*scid* Mäusen (Modell zur Transplantation humaner hämatopoetischer Zellen) konnte gezeigt werden, dass die LSZ nach einer unterschiedlichen Anzahl von Retransplantationen in der Lage waren eine AML in diesen Tieren hervorzurufen. Dies entspricht den unterschiedlichen Differenzierungsstufen von HSZ, die entweder ruhend in ihrer Nische vorliegen, oder schon etwas weiter entwickelt sind, so dass sie in den Prozess der Differenzierung eintreten und damit zur Regeneration des Blutes beitragen können (<sup>41</sup>Hope *et al.*, 2004). Eine weitere Tatsache, die für das Vorhandensein von LSZ als Ursache der Leukämien spricht, ist, dass es selbst einige Jahre nach Abschluss einer erfolgreich durchgeführten Chemotherapie (sofern keine Stammzelltransplantation erfolgt) noch zu Rückfällen kommen kann. Aufgrund der Eigenschaft von Stammzellen, sich nur sehr selten zu teilen, entkommen gerade diese einer kommerziellen Form von Chemotherapie, die darauf ausgerichtet ist, die sich schnell teilenden Zellen eines Tumors abzutöten. So kann es Jahre dauern, bis noch vorhandene Tumorstammzellen in den Differenzierungsprozess eintreten und damit wieder zur Entwicklung eines Pools an entarteten Zellen beitragen (Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007).

Nach heutigem Kenntnisstand teilen LSZ einige wichtige Eigenschaften mit HSZ. Dazu gehört unter anderem deren Potenzial zur Selbsterneuerung, aber auch das Potenzial über einen langen Zeitraum hinweg zu überleben und zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Differenzierung einzutreten. Wahrscheinlich werden diese Stammzeleigenschaften durch die Expression einer Gruppe von sogenannten Stammzell-Genen aufrecht erhalten (Übersicht in <sup>9</sup>Passegue *et al.*, 2003; <sup>42</sup>Rizo *et al.*, 2006). Hierzu gehört zum Beispiel die Re-Expression von Genen, die für wichtige Stammzell-assoziierte Oberflächenrezeptoren wie Cxcr4 und CD44 codieren. Diese Proteine übernehmen zum einen die Funktion des Rückhaltens der HSZ im Knochenmark (Überlebensschutz), spielen aber auch eine wichtige Rolle während der Migratrionsprozesse von HSZ in die Peripherie.

Die Frage nach der Herkunft der LSZ konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass eine direkte Transformation von HSZ stattfindet. So können die Stammzeleigenschaften beibehalten werden, aber die strenge Kontrolle und Regulation der Weiterentwicklung geht verloren. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass auch bereits determinierte Vorläuferzellen aufgrund von Mutationsereignissen Stammzeleigenschaften zurück erhalten, so dass ebenfalls keine normale Differenzierung mehr stattfindet. Dass LSZ tatsächlich aus bereits determinierten Vorläuferzellen resultieren können, kann zumindest durch deren *in vitro* Transduktion mit Vektoren zur Expression bestimmter Fusionsproteine wie zum Beispiel PML/RAR $\alpha$  oder MLL/ENL, gezeigt werden (Übersicht in <sup>42</sup>Rizo *et al.*, 2006).

Für die vorliegende Arbeit sind besonders MLL-assoziierte Leukämien und LSZ von Bedeutung. Dementsprechend wird in den folgenden drei Absätzen genauer auf das Vorkommen und die Funktion von MLL und dessen Fusionsproteinen eingegangen.

## 2.5 Mixed Lineage Leukemia (MLL)

Das englische Wort *Mixed Lineage Leukemia* beschreibt zweierlei. Zum einen wird mit dieser Bezeichnung tatsächlich eine bestimmte Form von Leukämie beschrieben, die wie das Wort bereits nahelegt, keine eindeutige Zuordnung der Leukämieform zu einer bestimmten Blutzelllinie zulässt. In der Regel tritt bei dieser Form von Leukämie eine Mutation auf, die das *Mixed Lineage Leukemia (MLL)* Gen auf Chromosom 11q23 betrifft. Obwohl diese Form von Leukämie zunächst morphologisch und histochemisch einer lymphatischen Leukämie entspricht, exprimieren die leukämischen Zellen in der Regel nicht das frühe lymphoide Oberflächenantigen CD10, stattdessen aber häufig die myeloiden Oberflächenantigene CD15 und CD65. Unter anderem diese Tatsache führte dazu, dass die Gruppe um Stanley J Korsmeyer die gesamtgenomischen Expressionsprofile von B-ALL und AML Patienten ohne Translokation des *MLL*-Gens mit ALL Patienten mit *MLL*-Translokation verglich. Mit Hilfe dieser Expressionsanalyse konnten etwa 250 Gene identifiziert werden, anhand derer MLL von ALL und AML unterschieden werden können (<sup>43</sup>Armstrong *et al.*, 2002).

Eine Translokation des *MLL*-Gens kann allerdings auch in Leukämien detektiert werden, die eindeutig als ALL oder AML diagnostiziert werden. Dies ist in etwa 7% der AML und 10% der ALL der Fall (<sup>44</sup>Wei *et al.*, 2008). Das Vorhandensein einer *MLL*-Translokation wird immer in Verbindung mit einer schlechten Prognose gebracht und hat lediglich eine Heilungschance von 15 bis 20% (Übersicht in <sup>45</sup>Krivtsov und Armstrong, 2007). Die *MLL*-Translokation wird in 50% der ALL Fälle identifiziert, die bei Kindern innerhalb des ersten Lebensjahres auftreten (Daten aus <sup>132</sup>ZAFES: Zentrum für Arzneimittelforschung, -entwicklung und sicherheit, FFM, Stand 2004). Dies legt nahe, dass das Translokationsereignis bereits *in utero* erfolgen kann. Weiterhin können *MLL*-Translokationen häufig in Patienten

diagnostiziert werden, die nach einer chemotherapeutischen Behandlung eine sogenannte Therapie-verursachte Leukämie entwickeln (<sup>46</sup>Sorensen *et al.*, 1994; Übersicht in <sup>47</sup>Hess, 2004; <sup>45</sup>Krivtsov und Armstrong, 2007).

### 2.5.1 Aufbau und Funktion der Wildtyp Form von MLL

Das *MLL*-Gen liegt auf Chromosom 11, Arm q, Locus 23 (11q23). Es umfasst über 100 kb und kodiert für ein sehr großes Protein, bestehend aus etwa 4000 Aminosäuren. Funktionell stellt *MLL* das Ortholog des *trithorax*-Gens (*trx*) aus *Drosophila melanogaster* dar und übernimmt dementsprechend eine sehr wichtige Funktion in der Aktivierung und Regulation von Entwicklungs-assoziierten Genen, wie den *Homeobox (Hox)*-Genen (<sup>48</sup>Milne *et al.*, 2002; <sup>49</sup>Nakamura *et al.*, 2002). Die *Hox*-Expression erfolgt während der Embryogenese in einer Art Profil, in dem die Gene in einer bestimmten Dosis und zu bestimmten Zeitpunkten exprimiert werden. Die translatierten Faktoren wirken in kombinatorischer Weise zur Festlegung der Segmentidentität entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos und zur Spezifizierung der Zelltypen. Dementsprechend ist die streng kontrollierte Regulation dieser Gengruppe von enorm großer Bedeutung während der Embryogenese (Übersicht in <sup>50</sup>Popovic und Zeleznik-Le, 2005).

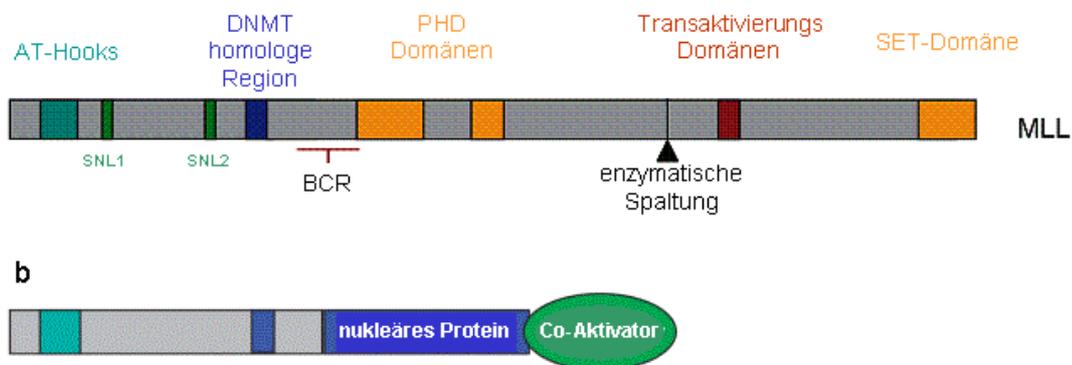
Die Funktion von MLL während der Hämatopoese ist bisher nicht eindeutig geklärt. Aus knock-out Studien wird ersichtlich, dass MLL während sehr frühen Stadien der Blutentwicklung eine Rolle spielen muss. Das Fehlen von *Mll* führt im murinen Modell zum Absterben des Embryos an Tag E10.5 der Entwicklung. Neben den erwarteten Defekten in der Segmentidentität ist die Hämatopoese im Dottersack und der fötalen Leber gestört. Die Kultivierung dieser defekten Vorläuferzellen in halbflüssiger Methylzellulose resultiert in einer verminderten Anzahl und Größe myeloider Kolonien. Zu späteren Zeitpunkten der Hämatopoese scheint MLL keine Rolle mehr zu spielen. Dies passt zum Expressionsprofil der *HoxA*-Gene, die stark in HSZ exprimiert werden aber nach Induktion der Differenzierung herunterreguliert werden müssen, so dass der Reifungsprozess stattfinden kann (Übersicht in <sup>51</sup>Ayton und Cleary, 2001; <sup>47</sup>Hess, 2004; <sup>50</sup>Popovic und Zeleznik-Le, 2005; <sup>45</sup>Krivtsov und Armstrong, 2007).

Das MLL-Protein enthält zahlreiche Domänen (Abbildung 3 a) und liegt in einem funktionellen Proteinkomplex vor. Nach Translation des MLL Proteins wird dieses zunächst im Zytoplasma enzymatisch gespalten. So entsteht ein 320 kDa-großer N-terminaler Teil und ein 180 kDa-großer C-terminaler Teil, die nicht-kovalent miteinander assoziiert bleiben. N-terminal befinden sich drei sogenannte AT-Haken, Bereiche über die MLL an AT-reiche Sequenzen der DNA binden kann, was zu einer Biegung der DNA führt. Es folgen zwei sogenannte *subnuclear localization domains* (SNL1 und SNL2), die für die Lokalisation des MLL-Proteins in speziellen Bereichen des Zellkerns notwendig sind. Weiter C-terminal liegt eine

Repressordomäne mit Homologie zur DNA-Methyltransferase (DNMT). Dieses Zink-Finger-Motiv wird auch als CxxC-Domäne bezeichnet und trägt zur Interaktion mit Co-Repressoren wie zum Beispiel HDACs und Polycomb-Proteinen (Gegenspieler von MLL bei Regulation der *Hox*-Gene) bei. Es folgt eine *plant homology domain* (PHD)-Domäne mit Homologie zu Bromodomänen. Mit Hilfe dieses Abschnittes kann MLL an acetylierte Lysine des Chromatins binden. Auf DNA-Ebene wird in diesem Bereich die Bruchpunkt-Region (*breakpoint cluster region*, BCR) identifiziert, die sich über 8,4 kb und 5 Exons erstreckt und in der der Bruch während eines Translokationsereignisses erfolgt. Im C-terminalen Teil liegen zwei weitere Domänen, die eine transkriptionell aktivierende Funktion übernehmen. (1) Eine Transaktivierungsdomäne, die mit der HAT CBP interagieren kann, wodurch weitere Co-Aktivatoren rekrutiert werden und die Chromatinstruktur entsprechender Zielgene geöffnet werden kann. (2) Die SET-Domäne mit Methyltransferase Funktion, die spezifisch die Methylierung von Lysin 4 innerhalb des Histons H3 bewirkt. Weiterhin kann über diese SET-Domäne eine Interaktion mit Proteinen des SWI/SNF-Komplexes erfolgen, wodurch eine Verschiebung der Nukleosomen innerhalb des Chromatins erfolgt (Nukleosomen-Remodelling). MLL-Zielgene werden somit vor allem durch epigenetische Veränderungen reguliert (Übersicht in <sup>47</sup>Hess, 2004; <sup>50</sup>Popovic und Zeleznik-Le, 2005).

Kommt es nun während der Zellteilung zu einer Translokation des *MLL*-Gens, so wird in der Regel der 5'Bereich des *MLL*-Gens so an den 3'Bereich eines weiteren Gens fusioniert, dass ein offener Leserahmen bestehen bleibt. Dies führt zur Expression eines Fusionsproteins, in dem bis zu 1400 der N-terminalen Aminosäuren von MLL erhalten sind. Mittlerweile sind über 50 potenzielle Fusionspartner von MLL identifiziert, deren Wildtyp Funktion häufig noch nicht bekannt ist. Zusammenfassend können die Fusionspartner in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: (1) Membranständige oder cytoplasmatische Proteine, die eine Funktion in der Signaltransduktion haben oder (2) nukleäre Faktoren die häufig selbst Transkriptions-modulierende Funktion aufweisen (Abbildung 3 b; Übersicht in <sup>47</sup>Hess, 2004).

Drei der in Leukämien am häufigsten gefundenen MLL-Fusionsproteine sind MLL/AF4 (assoziiert mit Kinder pro-B-ALL), MLL/AF9 (häufig in AML) und MLL/ENL (in AML und ALL). In allen drei Fällen handelt es sich bei den Fusionspartnern um nukleäre Proteine, die eine transaktivierende Funktion aufweisen (Übersicht in <sup>51</sup>Ayton und Cleary, 2001). Im Folgenden werden die bisher vorhandenen Erkenntnisse bezüglich des Transformationsprozesses durch die MLL-Fusionsproteine MLL/AF9 und MLL/ENL erläutert.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des MLL Transkriptionsfaktors in seiner Wildtypform und als Fusionsprotein mit nukleärem Protein.** (a) Wildtyp-Potein: AT-Haken, DNA-Bindung; SNL, subnukleäre Lokalisation; DNMT homologe Domäne, Interaktion mit Co-Repressoren; PHD Domäne, Bindung an acetylierte Lysine; Aktivator-domäne, Interaktion mit Co-Aktivatoren; SET Domäne, Methyltransferase und Interaktion mit SWI/SNF Komplex. (b) MLL-Fusionsprotein: Die N-terminal gelegenen MLL-Domänen bleiben im Fusionsprotein erhalten, der C-terminale Teil kann gegebenenfalls mit Co-Aktivatoren interagieren. Übernommen und modifiziert aus <sup>47</sup>Hess, 2004.

### 2.5.2 Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen durch MLL/AF9 und MLL/ENL

Innerhalb der letzten Jahre konnte mehrfach gezeigt werden, dass MLL-Fusionsproteine in der Lage sind, murine sowie humane hämatopoetische Vorläuferzellen vollständig zu immortalisieren (<sup>52</sup>Lavau *et al.*, 1997; Zeisig *et al.*, <sup>53</sup>2003 und <sup>54</sup>2004; <sup>55</sup>Cozzio *et al.*, 2003; <sup>44</sup>Wei *et al.*, 2008). Dies erfolgt nach heutigen Erkenntnissen unter anderem durch die Re-Aktivierung von *Hox*-Genen und *Hox*-Cofaktoren. Für die Transformation muriner Vorläuferzellen mit MLL/AF9 konnte gezeigt werden, dass die Re-Aktivierung von *HoxA9* und *HoxA7* eine wichtige Rolle für die Etablierung und Erhaltung einer immortalen Zelllinie spielen (<sup>56</sup>Ayton und Cleary, 2003; <sup>57</sup>Krivtsov *et al.*, 2006), während die Expression von MLL/ENL zur Hochregulation von *HoxA9* und dem *Hox*-Cofaktor *Meis1* führt (<sup>54</sup>Zeisig *et al.*, 2004). In diesen Experimenten kommt es durch die starke Expression dieser Gene zu einem myeloiden Differenzierungsblock und die so transformierten Zellen lösen eine Leukämie in konditionierten Empfängertieren aus. Zudem können innerhalb dieser transformierten Zellpools leukämische Stammzellen identifiziert werden (<sup>55</sup>Cozzio *et al.*, 2003; <sup>58</sup>Somervaille und Cleary, 2006). In MLL/AF9 transformierten leukämischen Stammzellen kann eine Reaktivierung des *HoxA*-Expressionsprofils nachgewiesen werden, das dem in HSZ beziehungsweise Vorläuferzellen vorkommenden entspricht (<sup>58</sup>Sommervaille und Cleary, 2006). Auch unabhängig von MLL-Translokationen werden deregulierte *Hox*-Faktoren und deren Co-Aktivatoren häufig in Zusammenhang mit der Induktion einer akuten Leukämie gebracht (zur Übersicht siehe <sup>59</sup>Eklund, 2007). Obwohl in den MLL-Fusionsproteinen nur noch

der vorwiegend reprimierend wirkende N-terminale Teil von MLL erhalten ist, findet eine Aktivierung von MLL-Zielgenen statt. Dies resultiert vermutlich aus der Tatsache, dass auch MLL-Fusionsproteine weiterhin in einem großen Proteinkomplex vorliegen, in dem die „neuen“ C-terminalen Teile der fusionierten Proteine Interaktionen mit Transkriptions-aktivierenden Proteinen eingehen können (Abbildung 3 b). Für die fusionierten Teile von AF9 und ENL konnte gezeigt werden, dass diese Proteine Transaktivierungsdomänen innerhalb der C-Termini aufweisen, die für den Transformationsprozess wichtig sind. Somit scheint es naheliegend, dass MLL-Zielgene wie *Hox*-Gene auch durch MLL-Fusionsproteine (fehl)reguliert werden können (Übersicht in <sup>45</sup>Krivtsov und Armstrong, 2007; persönliche Kommunikation mit Robert Slany).

## **2.6 Identifikation des MADS-box Transkriptionsfaktors Mef2c als möglichem Regulator in der Leukämogenese und Hämatopoese**

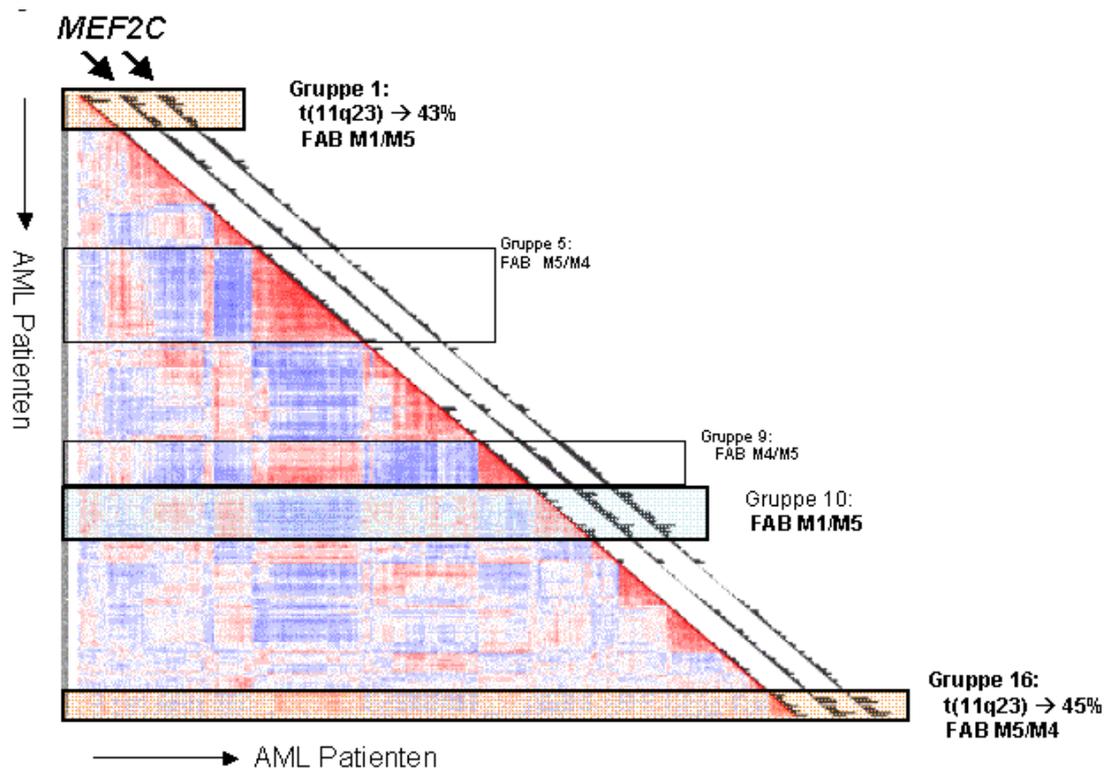
Vor allem die innerhalb der letzten Jahre etablierte Methode der gesamtgenomischen Expressionsanalyse ermöglichte es, das genetische Expressionsprofil entarteter Zellen von Tumorpatienten mit dem normaler Zellen aus gesunden Geweben zu vergleichen. Diese Analysen bewirkten einen großen Fortschritt für die Erforschung der auf zellulärer Ebene fehlregulierten Prozesse.

In einer Studie der Gruppe um Peter Valk und Ruud Delwel wurde das gesamtgenomische Expressionsprofil von insgesamt 285 Knochenmark- oder Blutproben von AML Patienten erstellt. Es wurde die Expressionsstärke von 13.000 Genen ermittelt, was vor allem dem Ziel diente, eine statistisch signifikante Grundlage für die Korrelation molekularer Veränderungen mit dem prognostischen Verlauf der AML-Erkrankung zu etablieren. Auf Grundlage ähnlicher Genexpressionsprofile konnten die Patienten in insgesamt 16 Gruppen eingeteilt werden. Ein vergleichbares genetisches Profil ergab sich häufig im Zusammenhang mit der Expression einer der in Abschnitt 2.4.1 erwähnten Translokationen (<sup>60</sup>Valk *et al.*, 2004).

Etwa die Hälfte der Patienten der Gruppe 1 (43%) und 16 (45%) wiesen MLL-Translokationen auf. Eine genauere Untersuchung der Expressionsprofile dieser beiden Patientengruppen in unserem Labor identifizierte die starke Hochregulation eines bisher für die Leukämogenese/Hämatopoese eher unbekanntes Gens. Dieses codiert für den *MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response* (MADS)-box Transkriptionsfaktor *Myocyte Enhancer Factor 2 C* (*MEF2C*) (Abbildung 4). Die Hochregulation von *MEF2C* wurde in einem weiteren Cluster ohne *MLL*-Translokation (Gruppe 10) detektiert. Interessanterweise wiesen die Leukämien aller Patienten mit Hochregulation von *MEF2C* einen monozytären Phänotyp auf (Gruppe 1 FAB M1/M5; Gruppe 10 FAB M1/M5; Gruppe 16 FAB M4/M5, Abbildung 4), dieser war allerdings umgekehrt nicht streng korreliert mit hoher *MEF2C*-Expression und herrschte

auch in den Gruppen 5 und 9 vor (Abbildung 4).

In einer weiteren Studie wurde *Mef2c* als hochreguliert in transformierten murinen GMPs detektiert. Dies stand im Zusammenhang mit der Expression des MLL/AF9 Fusionsproteins und führte zur Hypothese, dass *Mef2c* ein direktes Zielgen von MLL und dessen Fusionsproteinen darstellt. Ebenso wie die *Hox*-Gene soll *Mef2c* wichtig für den Transformationsprozess der MLL-Fusionsproteine sein (<sup>57</sup>Krivtsov *et al.*, 2006).



**Abbildung 4: Gesamtgenomisches Expressionsprofil von 285 AML-Patientenproben.** Vertikal und horizontal ist jeweils die Genexpression aller 285 Proben aufgetragen, wodurch sich Bereiche mit positiv korrelierter Genexpression (rot) von Bereichen mit negativ korrelierter Genexpression (blau) abheben. Patienten mit ähnlichem Genexpressionsmuster konnten in 16 Gruppen unterteilt werden. Diese unterschieden sich durch die positive beziehungsweise negative Korrelation bestimmter Genexpressionsstärken voneinander. Innerhalb der Gruppen 1, 10 und 16 findet sich eine Hochregulation von *MEF2C* (farbig unterlegte Umrandung), in den Gruppen 1 und 16 in Verbindung mit einer *MLL*-Translokation. Alle Gruppen mit Hochregulation von *MEF2C* wiesen einen monozytären AML-Subtyp auf. Übernommen und modifiziert aus <sup>60</sup>Valk *et al.*, 2004).

Auch in unserem Labor wurde *Mef2c* als möglicher wichtiger Regulator in der Leukämogenese/Hämatopoese identifiziert, allerdings unabhängig von MLL-Fusionsproteinen. Dies war das Resultat einer Insertionsmutagenese mit deren Hilfe (kooperierende) Onkogene detektiert werden können. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass Retroviren in der Lage sind, sich als sogenannte Proviren in das Genom ihrer Wirtszellen zu integrieren. Diese Integration verläuft nahezu zufällig und ungerichtet. Kann ein Provirus in verschiedenen Zellen allerdings gehäuft innerhalb eines bestimmten DNA-Abschnittes identifiziert werden, so ist die

Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Integration zur Veränderung der Expression eines benachbarten Gens führt, so dass die betroffenen Zellen *in vivo* einen Wachstumsvorteil erhalten. Dies kann zu einer malignen Akkumulation dieser Zellen führen. Integrationsereignisse in Bereichen, die in unabhängigen Tumoren gehäuft gefunden werden, werden als *common integration site* (CIS) bezeichnet und deuten darauf hin, dass in diesem Bereich des Genoms Gene liegen, deren Dysregulation zur Tumorgenese führen kann (<sup>61</sup>Jonkers und Berns, 1996).

Zur Identifikation von CISs wurde ein in unserem Labor gut etabliertes Mausmodell der chronischen myeloischen Leukämie (CML) herangezogen. In diesem Mausstamm ist das Gen, das für den myeloiden Transkriptionsfaktor *Icsbp* codiert, ausgeschaltet (C57Bl/6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>, kurz B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>). Neugeborene und junge Mäuse sind vital und fertil, zeigen allerdings eine verstärkte Proliferation und Akkumulation an granulozytären Zellen in allen hämatopoetischen Organen. Dies spiegelt die mögliche Situation in einer humanen CML wider (<sup>62</sup>Holtschke *et al.*, 1996). Während der chronischen Phase ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die stärker proliferierenden Zellen Mutationen ansammeln, die im Ergebnis zu einem Wachstumsvorteil der Zellen und damit zum Einleiten der akuten Phase führen (kooperierende Onkogene). Dies erfolgt im B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mausstamm in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahres, kann aber mit Hilfe der Methode der Insertionsmutagenese beschleunigt werden, so dass kooperierenden Onkogene experimentell gefunden werden können. Zu diesem Zweck erfolgte eine Infektion von neugeborenen B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Moloney Murinen Leukämievirus (Mo-MuLV). Die Integration dieses Virus führt normalerweise zur Induktion einer T-Zell Leukämie in Mäusen. Im Falle der infizierten B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten jedoch 29% der Tiere eine AML. In 20% der leukämischen Zellen konnte *Mef2c* als CIS identifiziert werden und war um das etwa 5-fache hochreguliert (M. Foster, M. Schwieger, C. Stocking, unpubliziert). Das onkogene Potenzial von *Mef2c* wurde durch dessen Überexpression in diesem Mausstamm bestätigt; eine akute myeloische Leukämie wurde mit einer mittleren Latenzzeit von nur 79 Tagen induziert (M. Schwieger, C. Stocking, unpubliziert). Die Leukämien der Tiere waren äußerlich geprägt von Kachexie und Atemnot. Weiterhin konnten eine Vergrößerung der Leber und Milz, sowie erhöhte Leukozytenzahlen und verminderte Hämatokritwerte diagnostiziert werden. Die Untersuchung des Knochenmarks zeigte eine hohe Anzahl an unreifen Blasten und mono- sowie granulozytären Vorläuferzellen. Ausstriche des peripheren Blutes zeigten eine überwiegende Anzahl an unreifen monozytären Elementen mit wenigen bis keinen granulozytären Zellen. In *in vitro* Colony Forming Assays mit *Mef2c*-transduzierten B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Knochenmarkstammzellen entwickelten sich fast exklusiv Makrophagen, was erneut mit einer verminderten Granulopoese einher ging. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen in Methylzellulose ausplattiert waren, in der die monozytäre/makrophagiale Entwicklung oder die granulozytäre Entwicklung unterstützt wurde (Zugabe

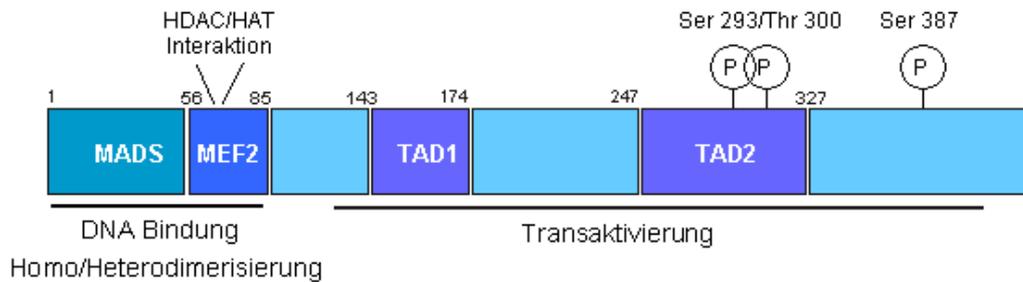
M-CSF versus G-CSF) (<sup>63</sup>Schüler und Schwieger *et al.*, 2008). Da für das B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Mausmodell eine Akkumulation von Granulozyten auf Kosten monozytärer Zellen beschrieben ist (<sup>64</sup>Scheller *et al.*, 1999), war die starke Entwicklung von Monozyten *in vivo* und Makrophagen *in vitro* nach *Mef2c*-Überexpression in B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Knochenmarkzellen unerwartet und lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass *Mef2c* neben des möglichen onkogenen Potenzials auch während der gesunden Hämatopoese eine Rolle spielen könnte.

### 2.6.1 Die Mef2-Familie der MADS-box Transkriptionsfaktoren

Die Mef2 Proteine gehören zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit MADS-Domäne. Diese Domäne ist benannt nach den erstgefundenen Faktoren der Familie: dem Hefe-Gen *MCM1*, den homöotischen Genen aus Pflanzen *Agamous* und *Deficiens* und dem *Serum response*-Gen aus Säugetieren. Säugetiere exprimieren insgesamt vier Mitglieder der Mef2 Familie, die als Mef2a, Mef2b, Mef2c und Mef2d bezeichnet werden und zu etwa 50% homolog sind. In *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* wird jeweils ein MEF2-homologes Gen gefunden (Übersicht in <sup>65</sup>Black und Olson, 1998).

### 2.6.2 Aufbau, Expression und knock-out Studien der Mef2 Proteine

Der Aufbau des N-terminalen Bereichs der Mef2 Proteine ist stark konserviert, während der C-Terminus sich zwischen den einzelnen Familienmitgliedern unterscheidet (Übersicht in Abb. 5). Die N-terminal gelegene MADS-Domäne besteht aus 57 Aminosäuren und ist gemeinsam mit der folgenden MEF-Domäne (29 Aminosäuren) wichtig für die spezifische Bindung an AT-reiche Zielsequenzen der DNA. Mit Hilfe von drei Aminosäuren innerhalb der MADS-Domäne können die Mef2-Bindungssequenzen von ähnlichen AT-Sequenzen unterschieden werden. Während das MADS Motiv stark konserviert zwischen allen MADS-Transkriptionsfaktoren ist (95% Homologie), ist die MEF-Domäne spezifisch für jedes Mef2 Protein. Über die beiden beschriebenen Domänen wird neben der Bindung an die DNA auch eine homo- und heterodimere Protein-Interaktion vermittelt. Der C-terminale Bereich der Proteine ist heterolog: Aufgrund von Signalsequenzen auf mRNA-Ebene, die zu alternativem Splicing führen, werden Proteine mit unterschiedlichen Domänen im C-terminalen Bereich exprimiert. Wichtige Domänen innerhalb des C-Terminus sind Transaktivierungsdomänen, innerhalb derer unterschiedliche Aminosäuren phosphoryliert werden können, was in der Regel zu einer verstärkten DNA-Bindung und Expression von Mef2-Zielgenen führt (Übersicht in <sup>65</sup>Black und Olson, 1998).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Mef2 Proteine.** Im N-terminalen Bereich befinden sich die MADS- und spezifische MEF2-Domäne. Beide Motive sind wichtig für die sequenzspezifische DNA-Bindung, sowie für die Homo- und Heterodimerisierung mit bHLH-Proteinen, Proteinen der Gata- und HDAC/HAT-Familie. Der C-terminale Bereich ist spezifisch für das Mef2c-Protein dargestellt. Hier liegen zwei Transaktivierungsdomänen (TAD1 und TAD2). Zur transkriptionellen Aktivierung können Threonin 300 (p38) und die Serine 293 (p38) und 387 (p38 und ERK5) phosphoryliert werden.

Die Mef2 Proteine werden im adulten Organismus vor allem in allen drei Muskelgewebetypen exprimiert, aber auch in Gehirn, Knochen, lymphatischen- und Endothelzellen. Während der Embryogenese werden Mef2 Proteine in der Neuralleiste, sowie in mesodermalen Bereichen exprimiert, die an der Bildung des Herzens beteiligt sind. Zellen der Neuralleiste durchlaufen zunächst eine endotheliale/mesenchymale Transition um dann in spezifische Bereiche des Embryos zu migrieren und dort den Ursprung für die Entwicklung von unter anderem Neuronen, Skelett- und glatte Muskulatur, Knorpelzellen und Knochenzellen zu bilden. Das embryonale Expressionsmuster steht somit in Einklang mit den sehr gut untersuchten Funktionen der Mef2 Proteine für die Entwicklung der Herz- und Skelettmuskulatur, sowie in der neuronalen Entwicklung (Überblick in <sup>66</sup>Potthoff und Olson, 2007). Speziell für den in dieser Arbeit untersuchten Faktor Mef2c konnten mit Hilfe von Keimzell-knock-out und konditionalen knock-out Studien wichtige Funktionen während der oben genannten Prozesse entschlüsselt werden. Eine vollständige Deletion der *Mef2c*-Allele (muriner Locus: Chromosom 13qC3; humaner Locus: Chromosom 5q14) in Keimzellen führt zum Absterben des Embryos an Tag E9.5 *post coitum* aufgrund fehlender Schleifenbildung des anterioren Aortenbereiches, was die Grundlage zur Ausbildung des rechten Herzventrikels darstellt (<sup>67</sup>Lin *et al.*, 1997; <sup>68</sup>Bi *et al.*, 1999). Weitere Defekte sind zum Beispiel eine unvollständige Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems (<sup>68</sup>Bi *et al.*, 1999), craniofaziale Defekte und neonatale Lethalität nach konditionaler Deletion der *Mef2c*-Allele in der Neuralleiste (<sup>69</sup>Verzi *et al.*, 2007) und unvollständige Knochenbildung nach konditionaler Deletion in Knorpelgewebe (<sup>70</sup>Arnold *et al.*, 2007). Wird *Mef2c* konditional in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen ausgeschaltet, so kommt es zu einer verlangsamten Differenzierung der Neuronen, während das Überleben und die Proliferation dieser Zellen nicht beeinflusst sind (<sup>71</sup>Li *et al.*, 2008).

### 2.6.3 Funktion und Aktivitäts-beeinflussende Faktoren der Mef2 Proteine

Allgemein kommt den Mef2 Proteinen eine enorm wichtige Bedeutung während der Muskelentwicklung zu. Dies wird vor allem durch die Tatsache verdeutlicht, dass alle Gene, die während der Muskelentwicklung eine Rolle spielen, regulatorische Sequenzen zur Bindung von Mef2 Faktoren aufweisen. Die frühen Entwicklungsprozesse werden durch die Interaktion von Mef2 Proteinen mit myogenen Transkriptionsfaktoren der MyoD-Familie induziert. Diese Proteine enthalten basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motive, worüber die Interaktion mit Mef2 erfolgt. Ein weiteres bHLH-Protein, das während der Muskelentwicklung mit Mef2 Proteinen interagieren kann, ist Twist. Dies hemmt die Myogenese und ist somit Gegenspieler der Funktion von Mef2/MyoD Komplexen. Auch in anderen Geweben können Mef2 Proteine mit bHLH-Proteinen interagieren, so zum Beispiel mit Mash1 während der neuronalen Entwicklung. Zudem ist eine Interaktion mit Proteinen der Gata Familie während der Herzmuskelentwicklung bekannt (Übersicht in <sup>65</sup>Black und Olson, 1998).

Die Mef2 Proteine steuern eine Vielzahl biologischer Funktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Schutz vor Zelltod. Diese teilweise antagonistischen Prozesse werden neben der Assoziation mit verschiedenen Partnerproteinen in unterschiedlichen Zelltypen vor allem durch Modulation der Mef2 Aktivität durch äußere Stimuli gesteuert. Als solche Stimuli können zum Beispiel Faktoren dienen, die in Stresssituationen gebildet werden und zunächst zur Induktion von Mitogen-aktivierten-Phosphorylierungs (MAP)-Kinase-Signalwegen führen. Für die Mef2 Proteine ist gezeigt, dass sie an spezifischen Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Transaktivierungsdomäne durch die MAPK p38 und ERK5 (*extracellular regulated kinase 5*) phosphoryliert werden können. Dies führt häufig zur Induktion des *early response* Gens *c-jun*, dessen Genprodukt gemeinsam mit *c-fos* den aktiven Transkriptionsfaktorkomplex AP1 bildet (Übersicht in <sup>72</sup>McKinsey *et al.*, 2002). Auch äußere Stimuli, die eine Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration zur Folge haben, beeinflussen die Aktivität der Mef2 Proteine. Die veränderte Calcium-Konzentration kann sowohl die Calcium-Calmodulin-Kinase (CaMK), als auch die Phosphatase Calcineurin aktivieren.

Die CaMK erhöht auf zweierlei Art die transkriptionelle Aktivität von Mef2 Proteinen. Zum einen kann eine direkte Phosphorylierung im Bereich der MADS-Domäne erfolgen, oder aber es werden Mef2 Partnerproteine phosphoryliert. Dies sind HDACs der Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9), die sich von anderen HDACs durch eine spezifische 18-Aminosäuren umfassende Mef2-Bindungsdomäne im N-terminalen Bereich unterscheiden (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000; <sup>72</sup>McKinsey *et al.*, 2002; <sup>27</sup>Haberland *et al.*, 2009). Phosphorylierung im N-terminalen Bereich der HDACs durch die CaMK führt zur Rekrutierung von 14-3-3 Chaperonproteinen, was sowohl die Dissoziation des Mef2/HDAC Komplexes, als auch die Translokation der HDACs

ins Zytoplasma zur Folge hat. Die frei vorliegenden Mef2 Proteine können zur Aktivierung ihrer Zielgene nun mit HATs wie der p300 interagieren. Die Assoziation von Mef2 Proteinen über deren MADS/Mef2-Domäne mit HDACs der Klasse IIa ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus in Bezug auf die Zelltyp- und Kontext-spezifische Expression der Mef2 Zielgene (Übersicht in <sup>72</sup>McKinsey *et al.*, 2002; <sup>66</sup>Potthoff und Olson, 2007).

#### **2.6.4 Rolle der Mef2 Proteine während der Hämatopoese**

Wie bereits erwähnt, war zu Beginn dieser Arbeit wenig über eine Funktion von Mef2 Proteinen im hämatopoetischen System bekannt. Analysen in unserem Labor ergaben, dass sowohl *Mef2c* als auch *Mef2d* in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (<sup>63</sup>Schüler und Schwieger *et al.*, 2008). Die beschriebene Stimuli-induzierte Hochregulation des *early response* Gens *c-jun* durch Mef2 Proteine in Fibroblasten-Zelllinien konnte auch in hämatopoetischen Zelllinien wie HL60 und RAW264.7 nachgewiesen werden. Die Auswirkung dieser Regulation wurde allerdings nicht weitergehend untersucht (<sup>73</sup>Shin und Han, 1999; <sup>74</sup>Han *et al.*, 1997). In einer humanen Zelllinie, etabliert aus der Knochenmarkprobe eines an pre-B-ALL erkrankten Patienten, konnte ein Fusionsprotein gefunden werden, das einen Teil von *MEF2D* beinhaltet – dieses Protein war das Resultat einer Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 19 wodurch das Fusionsgen *DAZAP1-MEF2D* gebildet und exprimiert wird (<sup>75</sup>Yuki *et al.*, 2004). Von Du *et al.* konnte *Mef2c* als kooperierendes Onkogen gefunden werden, das zur Beschleunigung einer durch Sox4-induzierten AML in Mäusen führte (<sup>76</sup>Du *et al.*, 2005).

Ein interessanter Aspekt in Bezug auf *MEF2(C)* als mögliches Zielgen von MLL-Fusionsproteinen im leukämischen Transformationsprozess, ist die Tatsache, dass MADS-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen eine wichtige Rolle als homöotische Faktoren – vergleichbar mit Hox-Faktoren in Vertebraten – spielen. So regulieren einige MADS-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* durch kombinatorisches Zusammenwirken die Spezifizierung und Entwicklung von Blütenorganen. Der strukturelle Aufbau der Pflanzen-Proteine gleicht dem der Mef2-Faktoren aus Vertebraten (Übersicht in <sup>77</sup>Robles und Pelaz, 2005).

### 3. Fragestellung

Während der Hämatopoese sind vor allem Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Damit die einzelnen Differenzierungsprogramme geordnet und aufeinander abgestimmt ablaufen können, wird die Aktivität dieser Proteine auf vielen verschiedenen Ebenen reguliert. Eine Dysfunktion oder Fehlregulation solcher Faktoren kann schwerwiegende Auswirkungen auf den normalen Ablauf der Hämatopoese haben. Die häufige Folge ist eine maligne Entartung von Blutzellen, was zur Entstehung einer Leukämie führen kann. Dementsprechend ist die Erforschung grundlegender Differenzierungsprozesse eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Leukämieentstehung, sowie für die Entwicklung therapeutischer Ansätze.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion eines in der Hämatopoese/Leukämogenese bisher weitgehend unbekanntes Transkriptionsfaktors – der MADS-box Transkriptionsfaktor Mef2c – charakterisiert werden. Das für dieses Protein codierende Gen wurde in AML-Patientenproben, die teilweise Translokationen des *MLL*-Gens aufwiesen, als hochreguliert gefunden. Zunächst sollte untersucht werden, ob Mef2c für die leukämische Transformation von murinen Knochenmarkzellen durch ein MLL-Fusionsprotein – MLL/ENL – wichtig ist. Weiterhin sollte der Phänotyp der durch MLL/ENL-transformierten Knochenmarkzellen, mit und ohne (Über)expression von *Mef2c*, charakterisiert werden. Die so etablierten Zelllinien sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet werden, um Unterschiede in ihren leukämogenen Eigenschaften, des Migrationsverhaltens und der Genexpression zu untersuchen.

Neben der Hochregulation von *MEF2C* in AML-Patientenproben wurde *Mef2c* als *common integration site* in AML von *B6-Icsbp<sup>-/-</sup>* Mäusen nach Infektion mit dem Moloney Murinen Leukämievirus identifiziert. Die Überexpression von *Mef2c* in *B6-Icsbp<sup>-/-</sup>* Knochenmarkzellen induziert *in vivo* eine AML mit überwiegend myeloiden Blasten und monozytären Vorstufen im Knochenmark und Blut und führt *in vitro* zur exklusiven Reifung von Makrophagen. Da die starke monozytäre Entwicklung der zur Mef2c-Überexpression manipulierten Knochenmarkzellen dieses Mausmodells unerwartet war, sollte in der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht werden, ob Mef2c auch eine Rolle während der gesunden Hämatopoese spielt. Hierzu sollte zunächst die Differenzierung früher Knochenmarkzellen analysiert werden, die entweder zur Überexpression von *Mef2c* manipuliert wurden, oder in denen *Mef2c* in einem konditionalen knock-out Hintergrund ausgeschaltet war. In unterschiedlichen *in vitro* Experimenten sollten nach Stimulation mit verschiedenen äußeren Faktoren die Differenzierungseigenschaften durch Charakterisierung der Expression von Oberflächenantigenen und von intrazellulären Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Kits

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DecaLabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Gel Extraction Kit	Millipore (Schwalbach)
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche (Mannheim)
Lineage Cell Depletion Kit (mouse)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate	Promega (Mannheim)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Taq Polymerase Core Kit	Qiagen (Hilden)
Vybrandt CFDA-SE Cell Tracer Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

#### 4.1.2 Mausstämme

Für die intraperitoneale Injektion immortalisierter MLL/ENL Zelllinien wurden NOD/scid Mäuse (<sup>78</sup>Prochazka *et al.*, 1992) verwendet.

Für die Entnahme von Knochenmark zu Transplantationszwecken und zur Herstellung immortalisierter Zelllinien wurden konditionale *Mef2c* knock-out Mäuse verwendet (<sup>70</sup>Arnold *et al.*, 2007; <sup>67</sup>Lin *et al.*, 1997). *Mef2c<sup>fl/+</sup>* und *Mef2c<sup>-/+</sup>* Mäuse wurden über mindestens 10 Generationen mit C57Bl/6 (*Mef2c<sup>+/+</sup>*) verpaart um aus deren Nachkommen *Mef2c<sup>fl/-</sup>* und *Mef2c<sup>+/-</sup>* Mausstämme zu generieren. Zur Exzision des *Mef2c*-floxed Allels im hämatopoetischen System erfolgte eine weitere Verpaarung der *Mef2c<sup>fl/-</sup>* Mäuse mit MxCre B6 Mäusen (<sup>79</sup>Kühn *et al.*, 1995), gefolgt von einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 500 µg/ml polyinosin-polycytidyl Säure (polyIC) der Neugeborenen. Die Effizienz der Exzision wurde durch anschließende Genotypisierung bestimmt. Um entsprechende Kontrollmäuse zu generieren, wurden ebenfalls *Mef2c<sup>+/-</sup>*-Mäuse mit MxCre B6 Mäusen verpaart und die Neugeborenen in gleicher Weise mit polyIC behandelt.

Für die Transplantation *in vitro* veränderter Knochenmarkzellen wurden lethal bestrahlte C57Bl/6 Ly5.1 Mäuse verwendet. Dieser Mausstamm diente ebenfalls zur Entnahme von Knochenmark für *in vitro* Methylzellulose Experimente.

#### 4.1.3 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurde der *Escherichia coli* Laborstamm XL10-Gold® ((ultrakompetent, blau/weiß Selektion) (Stratagene, La Jolla, USA)) verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien mit Ca<sup>2+</sup>, die Transformation, die Kultivierung und die Stammhaltung erfolgten nach Standardmethoden (<sup>80</sup>Sambrook und Russell, 2000).

#### 4.1.4 Zelllinien

##### 4.1.4.1 Primäre Zellen

Knochenmark isoliert aus den Femuræ und Tibiæ von C57Bl/6 oder konditionalen *Mef2c*<sup>+/+</sup>/MxCreB6 beziehungsweise *Mef2c*<sup>fl/-</sup>/MxCreB6 Mäusen, sortiert auf frühe Oberflächenmarker (lineage<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, sca<sup>+</sup>; negative Selektion von Zellen, die CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr1, 7-4 oder Ter119 exprimieren).

##### 4.1.4.2 Murine Zelllinien

NIH3T3	Aus NIH Swiss Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie ( <sup>122</sup> Jainchill <i>et al.</i> , 1969). ATCC #CRL-1658. Kultivierung in DMEM mit 10% FCS.
293T	Humane, embryonale Nierenzellen ( <sup>123</sup> Lebkowski <i>et al.</i> , 1985). Kultivierung in DMEM mit 10% FCS.
Sc-1	Aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnene Zelllinie ( <sup>124</sup> Hartley und Rowe, 1975). ATCC #CRL-1404. Kultivierung in MEM mit 10% FCS.
FDCP-1	murine Knochenmarkzellen aus B6D2F1-Mäusen mit geblockter Differenzierung ( <sup>125</sup> Dexter <i>et al.</i> , 1980). Die Zellen wachsen IL-3 <sup>1</sup> abhängig in Suspension und sind G-CSF sensitiv. DSMZ #ACC368. Kultivierung in RPMI1640 mit 10% FCS.
M/E	murine Knochenmarkzellen ( <i>Mef2c</i> <sup>Δ/-</sup> oder <i>Mef2c</i> <sup>+/+</sup> ) immortalisiert mit gammaretroviralem MLL-ENL Expressionsvektor (Mys-iYFP oder MSCVneo). Die Zellen werden in keiner Zelldatenbank geführt. Kultivierung in RPMI1640 mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10 ng/ml murinem IL-3, murinem GM-CSF, humanem IL-6 und 100 ng/ml murinem SCF.

<sup>1</sup>Überstand von IL3 produzierenden Zellen, X63-AG8-653 Plasmazytomzellen, transfiziert mit dem Vektor BMGNeo-IL3 (<sup>130</sup>Karasuyama und Melchers, 1988)

## 4.1.5 Medien

### 4.1.5.1 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani Medium (LB)	10 g/l Bacto-Trypton (BD Heidelberg), 5 g/l Bacto-Hefeextrakt (BD, Heidelberg), 10 g/l NaCl; pH 7,5 mit NaOH
Luria-Bertani Agar	15 g/l Agar in LB Medium

Die Medien wurden 20 Minuten bei 121°C (1,1 kg/cm<sup>2</sup>) autoklaviert. Dem Agar wurde nach Abkühlen auf 55°C 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, bevor er in Petrischalen gegossen wurde. Dem Flüssigmedium wurde vor Gebrauch 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

### 4.1.5.2 Zellkulturmedien und -lösungen

FCS	Fötales Kälberserum (Sigma, Taufkirchen)
Serum Supreme	Synthetisch modifiziertes Kälberserum (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Penicillin/Streptomycin	5000 U/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	20% (v/v) Trypsin/EDTA 10 x Konzentrat (Biochrom, Berlin) in Wasser
DMEM (NIH3T3)	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 10% (v/v) FCS
DMEM (293T)	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 10% (v/v) Serum Supreme, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat
DMEM/HEPES (293T)	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 20 mM HEPES (pH 7,2) (Invitrogen, Karlsruhe)
X-vivo 10 (Produktion Lentiviren)	BioWitthaker X-vivo 10 (Cambrex, USA; nicht mehr im Katalog)
SFEM (Knochenmarkzellen)	Serum Free Expansion Medium (StemCellTechnologies, Köln)
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO
IMDM	IMDM Trockensubstanz (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst in Wasser (auf 280 mOs); pH 7,6
RPMI1640	RPMI1640 Trockensubstanz (Invitrogen, Karlsruhe), gelöst in Wasser (auf 280 mOs); pH 7,4

RPMI1640 (FDCP-1)	RPMI1640, 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 8% (v/v) IL3 <sup>1</sup>
RPMI1640 (M/E)	RPMI1640, 10% (v/v) FCS, 1% mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10 ng/ml murines IL-3 (#mIL3-10; Strathmann, Hannover), murines GM-CSF (#315-03; Peprotech, Hamburg), humanes IL-6 (#200-06; Peprotech Hamburg), murines SCF (Ursula Just, Hannover)
Methylzellulose Complete	MethoCult GF M3434 (StemCell Technologies, Köln)
Methylzellulose ohne Zusätze	MethoCult GF M3234 (StemCell Technologies, Köln)

#### 4.1.6 Standardpuffer und Proteingele

1xTAE (DNA-Gele)	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1xTBE (DNA-Gele)	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
10xTBS	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)
1xTBS/Tween	1/10 10 x TBS, 0,5% Tween
10% TCA-Lösung	10 mg Trichloracetat in 100 ml 150 mM NaCl-Lösung
10xLaufpuffer (Proteingel)	2 M Glycin, 250 mM Tris Base
1xLaufpuffer (Proteingel)	1/10 10 x Laufpuffer, 1% SDS
Sammelgelpuffer (Proteingel)	500 mM Tris Base, 0,1% SDS, mit HCl auf pH 6,8 (exakt)
Trenngelpuffer (Proteingel)	1,5 M Tris Base, 0,1% SDS, mit HCl auf pH 8,8 (exakt)
Sammelgel (5%ig)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,05% TEMED
Trenngel (8,5%ig)	370 mM Tris/HCl (pH 8,8), 8,5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,05% TEMED
10% APS	10 g APS in 100 ml ddH <sub>2</sub> O
2xProbenpuffer (Proteingel)	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 25% Glycerol
3xProbenpuffer (Proteingel)	180 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6% SDS, 28% Glycerol, 0,001% Bromphenolblau

<sup>1</sup>Überstand von IL3 produzierenden Zellen, X63-AG8-653 Plasmazytomzellen, transfiziert mit dem Vektor BMGNeo-IL3 (<sup>130</sup>Karasuyama und Melchers, 1988)

Transferpuffer (Westernblot)	1 x Laufpuffer, 20% (v/v) Methanol
Block-Puffer (Westernblot)	1 x TBS, 0,5% Tween, 5% Magermilchpulver
Wasch-Puffer (Westernblot)	1 x TBS, 0,5% Tween, 2% Magermilchpulver

#### 4.1.7 Antikörper

##### 4.1.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: primäre Antikörper für Westernblot-Analysen

Ziel-prot.	Erzeuger-org.	Antikörper-klonalität	Proteingröße	Bezeichnung	Bezugsquelle
Mef2c	Ziege	polyklonal	44 kDa	#sc-13266, E-17	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (SC), USA
c-jun	Kaninchen	monoklonal	43 & 48 kDa	#9165, 60A8	Cell Signaling, Danvers, USA
Pu.1	Kaninchen	polyklonal	40 kDa	#sc-352, T-21	Santa Cruz Biotechnology SC, USA
C/ebp $\alpha$	Ziege	polyklonal	42 kDa	#sc-9314, C-18	Santa Cruz Biotechnology, SC, USA
Tubulin	Maus	monoklonal Klon DM1A	60 kDa	#CP06	Oncogene Calbiochem, San Diego, USA

Die Antikörper wurden meist in einer Verdünnung von 1:1000 in 1xTBS/Tween mit 2% Magermilchpulver eingesetzt. Ausnahmen: Der Antikörper gegen c-jun wurde in einer 5%igen BSA-Lösung 1:1000 verdünnt, der Antikörper gegen Tubulin wurde 1:5000 in 1x TBS/Tween mit 2% Magermilchpulver verdünnt.

##### 4.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Ziege-HRP (#sc-2020)	IgG aus Esel
Anti-Kaninchen-HRP (#sc-2004)	IgG aus Ziege
Anti-Maus-HRP (#sc-2005)	IgG aus Ziege

Alle sekundären Antikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert und wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) bezogen. Verdünnung 1:5000 in 1xTBS/Tween, 2% Magermilchpulver.

### 4.1.7.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2: Antikörper für Durchflusszytometrie

Zielprotein	Klon	Isotyp	Kopplung	Bezugsquelle
CD11b	M1/70	IgG2b	APC	BioLegend, #101212
Gr1	RB6-8C5	IgG2b	PE	BioLegend, #108408
CD184	2B11/CXCR4	IgG2b	PE	BD, #551966
CD44	IM7	IgG2b	APC	BioLegend, #103012
CD45-LCA Kompensation	30-F11	IgG2b	PE, APC, FITC	BioLegend, #103106, #103112, #103108

### 4.1.8 Plasmide

Angegeben sind die laborüblichen Bezeichnungen mit einer genaueren Beschreibung der Plasmide. Plasmide, die mit R gekennzeichnet sind, wurden in unserem Labor hergestellt, Plasmide die mit # gekennzeichnet sind, stammen aus anderen Quellen.

#### 4.1.8.1 Helferplasmide für die Virusproduktion

R690	pSV40-gag/pol; trägt die MoMLV <i>gag</i> - und <i>pol</i> -Gene unter Kontrolle des SV40 Promotors.
#522	pEcoenv-I-puro; trägt das ökotrope <i>ecoenv</i> -Gen unter Kontrolle des EF1 $\alpha$ Promotors ( <sup>126</sup> Morita <i>et al.</i> , 2000).
R583	pCMVgagpol/RRE (M106); trägt die codierenden Sequenzen zur Expression der lentiviralen <i>gag</i> , <i>pol</i> und RRE Gene ( <sup>127</sup> Dull <i>et al.</i> , 1998).
R584	pRSVrev (M105); trägt die codierende Sequenz zur Expression des lentiviralen REV Gens ( <sup>127</sup> Dull <i>et al.</i> , 1998).
R861	pCMV-vsv-g; trägt das polytrope <i>vsv-g-env</i> -Gen unter Kontrolle des humanen CMV Promotors ( <sup>128</sup> Beyer <i>et al.</i> , 2002)

#### 4.1.8.2 Retrovirale Konstrukte

R860	SF91-CREiGFP; gammaretroviraler Vektor der für die CRE-Rekombinase kodiert ( <sup>21</sup> Schwieger <i>et al.</i> 2004)
#641	pMCs-Ig-eGFP; gammaretroviraler Vektor mit GFP als Reporter gen, einer LTR aus PCMV und einer MESV leader-Sequenz (T. Kitamura)
R1092	pMCs-Ig-Mef2c; trägt die codierende Mef2c $\alpha$ 1-Isoform kloniert aus IC402, GFP als Reporter gen, ( <sup>63</sup> Schüler und Schwieger <i>et al.</i> , 2008)
R1375	pMCs-Ig-Mef2c <sup>ASR</sup> ; trägt die codierende Mef2c $\alpha$ 1-Isoform in der die Bindungsstelle für HDAC4 mutiert wurde (A. Schüler 2007; <sup>83</sup> Lu <i>et al.</i> , 2000) und GFP als Reporter gen.

R1295	pMYs-Ig-MLL/ENL; trägt die codierende Sequenz der Translokation t(11;19) MLL/ENL (R. Slany) und GFP als Reporter gen ( <sup>131</sup> Kitamura <i>et al.</i> , 2003).
R1352	pMYs-iPac; gammaretroviraler Vektor, trägt die codierende Sequenz eines Puromycin-Resistenzgens (T. Kitamura).
R1350	pMYs-Mef2c; gammaretroviraler Vektor, trägt die codierende Sequenz der Mef2c $\alpha$ 1-Isoform in Verbindung mit dem Puromycin-Resistenzgen (M. Ziegler, C. Stocking, 2007).
R1373	pMYs- Mef2c <sup>ASR</sup> ; trägt die codierende Mef2c $\alpha$ 1-Isoform in der die Bindungsstelle für HDAC4 mutiert wurde in Verbindung mit dem Puromycin-Resistenzgen (A. Schüler, 2007; <sup>83</sup> Lu <i>et al.</i> , 2000).
R1331	pRMYs-i-venus; gammaretroviraler Vektor mit Venus als Reporter gen.
R1334	pRMYs-i-mJun-iV; trägt die codierende Sequenz von c-jun (Klon IRAK p961B1445Q2) in Verbindung mit Venus als Reporter gen.
R1337	pRMYs-i-MLL/ENL; trägt die codierende Sequenz der Translokation t(11;19) MLL/ENL (R. Slany) in Verbindung mit Venus als Reporter gen.
R1238	LeGO-iG-eGFP (piG1; pG-IRES1); Lentiviraler Vektor mit GFP als Reporter gen, trägt Enhancer/Promotor Sequenz des gammaretroviralen SFFV zur Transkription codierender Sequenzen und einen H1 Promotor zur Transkription einer shRNA ( <sup>129</sup> Weber <i>et al.</i> , 2008)
R1297	LeGO-iG-Mef2c; trägt die codierende Mef2c $\alpha$ 1-Isoform.
R1307	LeGO-iG-shJun; exprimiert eine shRNA mit der Zielsequenz AGT AAC CCT AAG ATC CTA AA in der 5'Region von jun.
R1308	LeGO-iG-Mef2c-shJun; kombiniert die codierende Sequenz für die Mef2c $\alpha$ 1-Isoform und die Zielsequenz der shRNA gegen jun.

#### 4.1.9 Oligonukleotide

**Tabelle 3** Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ihrer Orientierung, dem Verwendungszweck, den Amplifikationsbedingungen für die quantitative real-time PCR und ihrer Sequenz dargestellt. Alle Oligonukleotide wurden zur spezifischen Bindung an Maus-Sequenzen entworfen. F: vorwärts; R: rückwärts

Primer	Amplifikation von, bp	qPCR Bedingungen Denaturierung / Anlagerung / Elongation / MgCl <sub>2</sub> Konzentration	Sequenz 5'-3'
CS 500 (F) CS 501 (R)	Mef2c, 180	95°9"/ 68°9"/ 72°8" / 2mM	act ggc cca ccc gtc tct gc ggg ggt tgc cgt atc cat tcc
CS 718 (F) CS 719 (R)	c-jun, 241	95°10"/ 58°8"/ 72°12"/ 3mM	tcc cct atc gac atg gac tc tga gtt ggc acc cac tgt ta
MKF19 (F) MKF20 (R)	Pu.1, 320	95°15"/ 62°10"/ 72°13"/ 3mM	aga tgc acg tcc tcg ata ct ttg tgc ttg gac gag aac tg
CS 716 (F) CS 717 (R)	C/ebp $\alpha$ , 233	95°10"/ 60°8"/ 72°10"/ 2,5mM	cca ggg cag gag gaa gat ac ctc cat gaa ctc acc cag ga
CS 765 (F) CS 767 (R)	Cxcr4, 225	95°10"/ 58°8"/ 72°10"/ 2,5mM	tgg aac cga tca gtg tga gt ccg tca tgc tcc tta gct tc

CS 998 (F) CS 999 (R)	Ccr2, 204	95°10"/ 58°8"/ 72°10"/ 2mM	caa ctc ctt cat cag gca ca gga aag agg cag ttg caa ag
CS1000 (F) CS1001 (R)	Ccr5, 267	95°10"/ 60°8"/ 72°10"/ 2mM	ctc tgg ctc ttg cag gat gg gtg agc agg aag agc agg tc
CS1052 (F) CS1053 (R)	Ccl6, 249	95°10"/ 59°8"/ 72°10"/ 2,5mM	agg ctg gcc tca tac aag aa tgc tta ggc acc tct gaa ctc
CS1056 (F) CS1057 (R)	Mmp8, 243	95°10"/ 57°8"/ 72°10"/ 5mM	ctg ctg aga att acc tac gaa aa agg tca ggt tag tgt gtg tcc a
CS1022 (F) CS1023 (R)	Mmp12, 292	95°10"/ 59°8"/ 72°10"/ 2mM	gct gtc aca aca gtg gga ga ggt caa aga cag ctg cat ca
CS1020 (F) CS1021 (R)	Mmp25, 225	95°10"/ 59°8"/ 72°10"/ 2mM	gac ctg gac ttt tgg gtc aa gca ttt gga ttt tgg gac ac
MKF35 (F) MKF36 (R)	Hprt, 250	95°15"/ 62°10"/ 72°16"/ 4mM	gct ggt gaa aag gac ctc t cac agg act aga aca cct gc

#### 4.1.10 Geräte

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

Durchflusszytometer	BD FACS Canto Flow Cytometer mit der FACS Diva Software Version 4.1.2 (BD, Heidelberg)
Durchflusszytometer	BD FACS Aria Flow Cytometer mit Sortierfunktion mit der FACS Diva Software Version 4.1.1 (BD, Heidelberg)
Light Cycler	Light Cycler Instrument mit der Light Cycler Software Version 3.5 (Roche, Mannheim)
Universalmikroskop	Axioplan 2 imaging (Carl Zeiss); Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss) mit der Image Access Enterprise 5 Software (Image Bildverarbeitung AG, Glattburg, Schweiz)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Wenn kein anderes Vorgehen beschrieben ist, wurde stets mit vorgewärmten Lösungen gearbeitet.

#### 4.2.1.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95% gehalten. Die Kultivierung erfolgte in beschichteten

Gewebekulturschalen und die Zellen wurden subkonfluent gehalten. Je nach Dichte der Zellen und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden diese alle 3-4 Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:6 bis 1:11 verdünnt. Für die Passagierung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin/EDTA (Inkubation 1 min, 37°C) abgelöst und in frischem Medium suspendiert. In Abhängigkeit der gewünschten Verdünnung wurden Aliquots der Zellen in frische Zellkulturschalen gegeben und mit einer geeigneten Menge Medium versetzt.

#### **4.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen**

Die Suspensionszellen (FDCP-1, M/E) wurden ebenfalls unter den oben aufgeführten Bedingungen kultiviert und abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:20 (FDCP-1) oder 1:5 bis 1:10 (M/E) verdünnt. Die Kultivierung erfolgte in nicht beschichteten 6-Loch-Platten.

#### **4.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Suspensionszellen**

Eingefrorene Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut. Danach erfolgte der zügige Transfer in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium (ohne Zytokine). Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (5 min, 300 × g) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendiert und anschließend kultiviert. Zum Einfrieren wurden die Zellen aus der Kulturschale entnommen und abzentrifugiert (RT, 5 min, 300 × g). Das Pellet wurde anschließend pro ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium suspendiert und jeweils 1 ml dieser Suspension in Einfrier Röhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden anschließend für einen Tag in Einfriercontainern (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) bei -70°C gelagert und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **4.2.2 Analyse von Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Analyse)**

Mit Hilfe des Durchflusszytometers können Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden, die entweder von Reporter genen gebildet werden oder mittels Antikörper an die Zellen gekoppelt sind. Die Messung am FACS erfolgt nach dem Standardprotokoll: Das Setup des FACS auf die jeweils zu vermessene Zelllinie oder Zellsuspension aus Organen erfolgt mit ungefärbten Zellen. Die FACS-Parameter werden dabei so eingestellt, dass die einzelnen Zellpopulationen im Dotplot gut zu unterscheiden sind und die Autofluoreszenz der Zellen nicht als positives Messergebnis erfasst wird. Die eGFP-(wird im FITC-Kanal gemessen), PE-, APC -Einzelfärbungen werden zur Kompensation genutzt. Die Kompensationsparameter werden dabei so eingestellt, dass die gefärbten Kontrollpopulationen gut eingegrenzt werden können, nicht in den jeweiligen anderen Kanal

strahlen und keine positiven Zellen aufgrund einer zu starken Kompensation verloren gehen. Nach Einstellung dieser Messparameter werden die Ansätze vermessen und anschließend nach Standardprotokoll ausgewertet. Die Messungen erfolgten stets mit einem geeigneten Volumen zwischen 300 µl und 500 µl.

#### 4.2.2.1 Sortieren von Zellen

Das Sortieren von Zellen anhand ihrer veränderten Fluoreszenzeigenschaften aufgrund der Expression eines Reportergens erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers mit Sortierfunktion, dem FACS Aria (BD, Heidelberg), in der Abteilung für Großgeräte am Heinrich-Pette-Institut durch Arne Düsedau. Als Einstellung wurde die höchste Reinheitsstufe gewählt, um zu gewährleisten, dass nur eGFP oder Venus positive Zellen für die Weiterkultivierung gewonnen wurden.

Für den Sortiervorgang wurden die Zellen den Kulturschalen entnommen, nach Zentrifugation (RT, 300 x g, 5 min) in PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Je  $3 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml PBS (1% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und durch ein Sieb in ein steriles FACS-Röhrchen überführt. Die eGFP beziehungsweise Venus exprimierenden Zellen wurden in vorgelegtes Medium sortiert. Die sortierten Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, anschließend entsprechend ihrer Zellzahl in geeigneten Kulturgefäßen und -medien ausplattiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Medium nach dem Sortieren grundsätzlich 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Erst nach dem vierten Passagieren der Zellen wurden diese wieder in Medium ohne Antibiotika gehalten.

#### 4.2.3 Herstellung infektiöser Viruspartikel

Die Herstellung infektiöser Viruspartikel erfolgte durch Kotransfektion von Plasmiden in als Produzentenzelllinie genutzte 293T-Zellen mittels Calciumphosphat. Dazu wurde ein Plasmid verwendet, das für das virale Genom codierte, aber nicht die *gag*-, die *pol*- und die *env*-Sequenzen trug. Für die Bildung von Viruspartikeln sind jedoch die viralen Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine, die von *gag*, *pol* und *env* codiert werden, notwendig. Zur Produktion lentiviraler Partikel ist weiterhin eine Expression des regulatorischen Gens *rev* notwendig. Daher wurden Plasmide mit diesen Sequenzen kotransfiziert, so dass von Zellen, die mit allen Plasmiden transfiziert waren, infektiöse Viruspartikel gebildet werden konnten. Den von der Produzentenzelllinie gebildeten Viren fehlten im Genom die *gag*-, *pol*- und *env*-Sequenzen, dadurch waren sie replikationsinkompetent, exprimierten aber nach Integration alle im viralen Genom vorhandenen Gene. Als *env*-Gen wurde das Gen für das ökotrope Hüllprotein Ecoenv (gammaretrovirale Vektoren) oder das polytrope Hüllprotein vsv-g (*vesicle stomatitis viral*

*g-protein*; lentivirale Vektoren) gewählt. Mit dem Ecoenv-Gen pseudotypisierte Viruspartikel sind in der Lage, Mauszellen über den CAT-1 Rezeptor zu infizieren, während der Rezeptor der zur Infektion von Zellen mit vsv-g pseudotypisierten Viren benutzt wird, noch nicht bekannt ist.

Die Transfektion erfolgte mit dem Profection Mammalian Transfection Kit. Für die Transfektion zur Produktion von Gammaretroviren wurden  $5 \times 10^6$  293T Zellen pro Kulturschale ( $\varnothing 10$  cm) etwa 16 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und neues Medium mit 25  $\mu$ M Chloroquin auf die Zellen gegeben. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 500  $\mu$ l 0,25 mM Calciumchlorid-Lösung aufgenommen. Für die Herstellung von Gammaretroviren wurden 5  $\mu$ g retroviraler Vektor, 10  $\mu$ g pSV40-gag/pol und 3  $\mu$ g pEcoenv pro Schale ( $\varnothing 10$  cm) verwendet.

Für das Herstellen der Lentiviren wurde ebenfalls direkt vor Transfektion das Medium der 293T-Zellen gewechselt, aber im Unterschied zur Herstellung der gammaretroviralen Pseudotypen durch neues Medium mit 25  $\mu$ M Chloroquin und 20 mM HEPES ersetzt. Die zu transfizierende Plasmid-DNA (10  $\mu$ g Lentivektor, 2  $\mu$ g vsv-g-env, 10  $\mu$ g gagpol/RRE, 5  $\mu$ g pRSVrev) wurde ebenfalls in einem Volumen von 500  $\mu$ l 0,25 mM Calciumchlorid-Lösung aufgenommen. Für den Transfektionsvorgang wurde das Plasmidgemisch tropfenweise zu 500  $\mu$ l 2 x HEPES Puffer gegeben, wobei mit einer gestopften Pasteurpipette zur besseren Durchmischung und zur Oberflächenvergrößerung Luft durch den Puffer geblasen wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Ansatzes, während der sich ein Calciumphosphat/DNA-Präzipitat bildete, wurde dieser tropfenweise auf die Zellen gegeben. Zur Produktion der Gammaretroviren wurde nach 8 Stunden das Medium abgenommen und durch 6 ml DMEM/HEPES ersetzt. Viermal in Folge wurde alle 8-14 Stunden virushaltiger Überstand abgenommen und die Zellen mit 6 ml frischem Medium gefüttert.

Zur Produktion der Lentiviren erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen ein Mediumwechsel, so dass die transfizierten 293T-Zellen jeweils über Nacht (etwa 13 Stunden) in DMEM/HEPES Medium kultiviert wurden, welches über Tag durch 10 ml X-vivo 10 Medium ersetzt wurde. Nach jeweils 8 Stunden wurde das virushaltige X-vivo 10 Medium abgenommen. Alle Virusüberstände wurden durch 0,22  $\mu$ m Millex GP Filter (Millipore, Schwalbach) gefiltert und bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 4.2.3.1 Titerbestimmung

Zur qualitativen Überprüfung der Virusüberstände wurden die Virustiter bestimmt, die angeben, wie viele infektiöse Einheiten pro Milliliter Überstand vorhanden sind. Für die Titerbestimmung sollten die Infektionsraten unter 10% liegen, um Mehrfachinfektionen und damit eine Verfälschung der erhaltenen Werte zu vermeiden. Dafür wurden  $5 \times 10^4$  Sc-1

Zellen je Loch in 500 µl Medium in 24-Lochplatten ausgesät. 3 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden diese je Loch mit 20 beziehungsweise 100 µl Virusüberstand versehen und es wurden 8 µg/ml Polybren zugesetzt. Nach Zugabe der Überstände wurden die Platten bei Raumtemperatur 1 Stunde bei 700 x g zentrifugiert. 72 Stunden nach der Infektion wurde im Durchflusszytometer bestimmt, wie viele Zellen das fluoreszierende Reporterprotein eGFP oder Venus exprimieren und daher infiziert sind. Dafür wurden die Sc-1 Zellen mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen gelöst und das Trypsin wurde durch Zugabe von 1 Volumen PBS (mit 10% FCS) inaktiviert. Anschließend wurden die eGFP- beziehungsweise Venus- haltigen Zellen mit dem Durchflusszytometer detektiert. Die infektiösen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) können nach der Formel  $T = Z \times A/V$  berechnet werden (T:Titer, Z: Anzahl der ausgesäten Zellen, A: Anteil der infizierten Zellen, durchflusszytometrisch bestimmt, V: Volumen des Virusüberstandes für die Infektion).

#### **4.2.4 Einsatz infektiöser Viruspartikel**

##### **4.2.4.1 Isolierung von Knochenmarkzellen**

12–16 Wochen alte Mäuse wurden nach Ethernarkose durch Genickbruch getötet und in Ethanol semisteril gehalten. Unter der Sterilwerkbank wurden die Ober- und Unterschenkel freigelegt und mittels Durchspülen mit einer 1 ml Spritze das Knochenmark in Medium geschwemmt. Nachfolgend wurden die Knochenmarkzellen in PBS/0,5% FCS/1% Penicillin/Streptomycin für zehn Minuten bei 300 x g gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen pro ml auf Eis gelagert. Um möglichst undifferenzierte Knochenmarkzellen anzureichern, folgte eine Selektion sogenannter Linien-negativer Knochenmarkzellen mit Hilfe des „Lineage Cell Depletion Kit (mouse)“. Hierbei wurde das isolierte Knochenmark zunächst mit einem Gemisch biotinylierter Antikörper (CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr1, 7-4 und Ter119) und anschließend mit einer Mischung aus Streptavidin-konjugierten Microbeads inkubiert. Die Knochenmarkzellen, die die entsprechenden Oberflächenantigene exprimieren, konnten im folgenden Schritt an eisenmagnetische Partikel einer Durchflusssäule gebunden werden und so von den Linien-negativen Stammzellen getrennt werden. Es folgte eine dreitägige Kultivierung von  $0,5 - 1 \times 10^6$  pro Vertiefung einer unbeschichteten 6-Loch-Platte in serumfreiem Expansionsmedium (SFEM) mit einem Zytokingemisch (100 ng/ml humanem IL-11 (#200-11; Peprotech, Hamburg), Flt3-Ligand (#300-19; Peprotech, Hamburg); 50 ng/ml murinem SCF (#250-03; Peprotech, Hamburg); 10 ng/ml murinem IL-3 (#mIL3-10; Strathmann, Hannover), der einerseits die Proliferation der Zellen anregen und andererseits eine weitere Differenzierung weitestgehend unterdrücken sollte.

#### 4.2.4.2 Infektion von Zellen mit gammaretroviralen Konstrukten

Stopplösung	PBS, 2% BSA
Waschlösung	HBSS, 25 mM HEPES

Für die Infektion von Suspensionszellen (Linien-negatives Knochenmark, FDCP-1-, M/E-Zellen) mit gammaretroviralen Vektoren wurden unbeschichtete 6-Loch-Platten mit Retronectin beschichtet. Hierzu wurden 2 ml Retronectin (50 µg/ml, TaKaRa, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) je Loch auf die Platten gegeben und diese entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Retronectinlösung wurde entfernt und zwecks Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 ml Stopplösung pro Loch inkubiert. Nach Entfernen der Stopplösung wurden die Platten einmal mit 3 ml Waschlösung pro Loch gewaschen. Zur Beschichtung der Platten mit Viren wurden 1,5 ml Virusüberstand pro Loch auf die Platten gegeben und diese zentrifugiert (20 min, 700 x g, RT). Dann wurde der Virusüberstand entfernt und verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden etwa  $1 \times 10^6$  Zellen pro Loch ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte eine analoge Beschichtung von neuen 6-Lochplatten und die Zellen wurden für eine zweite Infektion auf diese Platten umgesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen von den Retronectinplatten entfernt und auf Platten ohne Retronectin ausgesät und entsprechend der weiteren Verwendung kultiviert (siehe folgender Abschnitt).

Die beiden Infektionsschritte erfolgten in dem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Kulturmedium.

#### 4.2.5 Linien-negatives Knochenmark, infiziert mit MLL/ENL-Vektoren; Herstellung einer transformierten Zelllinie

Zur Herstellung zweier "Sets" transformierter, Mef2c exprimierender und nicht-exprimierender Zelllinien, wurde das immortalisierende Potenzial des MLL/ENL-Fusionsproteins genutzt (<sup>53</sup>Zeisig et al., 2003; <sup>55</sup>Cozzio et al., 2003). Im ersten Fall wurde Knochenmark aus *Mef2c*<sup>fl/-</sup> beziehungsweise *Mef2c*<sup>+/+</sup> Geschwistermäusen isoliert und mit einem MSCVneo-MLL/ENL codierenden retroviralen Vektor infiziert. Die Immortalisierung erfolgte im Labor von Robert Slany am Lehrstuhl für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Zur Entfernung des verbleibenden geflochtenen Mef2c-Allels in der *Mef2c*<sup>fl/-</sup> M/E-Zelllinie und zur Etablierung einer geeigneten Kontrollzelllinie erfolgte im Anschluss an die Immortalisierung eine Infektion der M/E-exprimierenden Zellen mit dem SF91-CREiGFP Vektor.

Das zweite Set transformierter Zellen wurde durch Isolation von bereits Mef2c

defizientem Knochenmark (*Mef2<sup>fl/-</sup>* x MxCreB6, polyIC injiziert, siehe Abschnitt Mausstämme) und anschließender Immortalisierung mit dem retroviralen MYs-MLL/ENL-GFP Vektor hergestellt. Um eine geeignete Kontrollzelllinie zu erhalten, wurde ebenfalls Knochenmark aus *Mef2c<sup>+/+</sup>* x MxCreB6 Geschwistermäusen (polyIC injiziert) isoliert und mit dem oben aufgeführten Vektor immortalisiert. Im Anschluss wurden die MLL/ENL infizierten Zellen als Triplikate in jeweils 1,1 ml Methylzellulose (MethoCult M3434) ausplattiert (siehe Abschnitt Colony Assays). Für insgesamt vier Wochen wurde nach jeweils sieben Tagen die Anzahl der Kolonien bestimmt, die Zellen der Kolonien in 1 x PBS suspendiert und jeweils in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro 35 mm Schale erneut in Methylzellulose unter den gleichen Bedingungen replattiert. Sieben Tage nach der vierten Replattierung wurden einzelne Kolonien gepickt und zunächst in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte in Expansionsmedium kultiviert. Es folgte ein sukzessives Hochziehen der immortalisierten Zellklone von 96-Loch-Platten über 24-Loch-Platten in 6-Loch-Platten. Die Untersuchung einzelner Klone zeigte keine Unterschiede in ihrem Proliferationsvermögen und des Phänotyps, so dass es möglich war jeden beliebigen Klon für weitere Experimente heranzuziehen.

#### **4.2.6 Anreicherung infizierter Zelllinien**

##### **4.2.6.1 FDCP-1 und M/E infiziert mit pMCs-Ig-eGFP beziehungsweise pMCs-Ig-Mef2c**

72 Stunden nach der Infektion erfolgte eine Anreicherung der infizierten Zellen mittels Sortierung auf eGFP-exprimierende Zellen. Diese wurden für weitere Versuche in Expansionsmedium kultiviert.

##### **4.2.6.2 M/E-Zellen infiziert mit MYs-iPac, MYs-Mef2c<sup>wt</sup>-iPac beziehungsweise Mys-Mef2c<sup>ASR</sup>-iPac**

Zur Anreicherung der mit für Puromycin-Resistenz codierenden gammaretroviralen Konstrukten infizierten M/E-Zellen erfolgte eine siebentägige Selektion in Expansionsmedium, dem 0,5 µg/ml Puromycin zugesetzt war. Die erfolgreich infizierten Zellen können in diesem Medium proliferieren, während nicht infizierte Zellen absterben. Die weitere Kultivierung nach der Puromycin-Selektion erfolgte in Expansionsmedium ohne Puromycin.

##### **4.2.7 Infektion von Linien-negativen Knochenmarkzellen mit lentiviralen Konstrukten**

Zur Infektion von etwa  $1 \times 10^6$  Linien-negativer Knochenmarkzellen mit lentiviralen Überständen erfolgte eine Zentrifugation der Knochenmarkzellen in 3 ml des Lentivirus-

enthaltenden X-vivo 10 Mediums inklusive 8 µg/ml Polybrene für eine Stunde bei 300 x g. Pro Tag erfolgten zwei solcher Zentrifugationsschritte, unterbrochen durch eine Inkubationszeit von etwa 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Vor jeder erneuten Zentrifugation wurden 2,5 ml des verwendeten Virusüberstandes durch 2,5 ml frischen Virusüberstand ersetzt. Die Infektion erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen. Während der Inkubation der Knochenmarkzellen im Brutschrank wurde dem Zell-Virusgemisch ebenfalls das unter Punkt 2.1.7.1 genannte Zytokingemisch zugesetzt. Nach 72 Stunden wurde die Infektionsrate anhand der eGFP Expression bestimmt, die eGFP positiven Zellen mittels Sortierung angereichert und in Colony-Forming-Assays ausplattiert.

#### **4.2.8 Colony-Forming-Assay**

Zur Beurteilung der Differenzierungseigenschaften und/oder der Selbsterhaltungskapazität retroviral transduzierter Knochenmarkzellen wurden diese nach Sortierung der eGFP- beziehungsweise Venus-exprimierenden Zellen in einem halbflüssigen Methylzellulosemedium kultiviert. Die halbflüssige Konsistenz der Methylzellulose ermöglicht es den vereinzelt ausplattierten sortierten Knochenmarkzellen durch Teilung Kolonien zu bilden. Für die Ansätze wurde Methylzellulose, die entweder die erythroide/myeloide (MethoCult GF 3434) oder die monozytäre/granulozytäre Differenzierung unterstützt (MethoCult GF 3234, versetzt mit 20 ng/ml murinem M-CSF (#315-02; Peprotech, Hamburg) oder murinem G-CSF (#414-CS; R&D, Wiesbaden-Norderstedt), beziehungsweise 10 ng/ml GM-CSF (#315-03; Peprotech, Hamburg), benutzt. Die Ansätze erfolgten in kleinen unbeschichteten Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) jeweils als Triplet. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^4$ ,  $2,2 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$  pro ml Methylzellulose und Zellkulturschale ausplattiert und bei 37°C in ausreichend humider Umgebung inkubiert. Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien gezählt und zur Beurteilung der Morphologie wurden  $5 \times 10^4$  Zellen auf Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim mit Giemsa und May-Grünwald Lösung (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Die Charakterisierung des Immunphänotyps erfolgte durch Anfärben der Zellen mit Phycoerythrin (PE)- oder Allophycocyanin (APC)-gekoppelten Antikörpern gegen die myeloid exprimierten Oberflächenrezeptoren Gr-1 und CD11b und anschließende durchflusszytometrischer Analyse.

#### **4.2.9 Vorbereitung von infizierten Knochenmarkzellen und M/E-Zellen für die Transplantation**

Zur Evaluation ob die retroviral veränderten Knochenmarkzellen eine Leukämie in Empfängermäusen auslösen können, wurden infizierte, unsortierte Knochenmarkzellen intravenös in die Schwanzvene lethal bestrahlter (9Gy; 23,5 Minuten) C57Bl/6-Ly5.1 Mäuse

injiziert. Dazu wurden die frisch infizierten Knochenmarkzellen zunächst vom Boden der 6-Loch-Platten mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Numbrecht) abgelöst und gezählt. Die entsprechende Anzahl an Zellen ( $1 \times 10^6$  zur Transplantation einer Maus) wurde in  $1 \times$  PBS gewaschen (5 min,  $300 \times g$ , RT) um Rückstände viraler Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem definierten Volumen IMDM-Medium ( $300 \mu\text{l}$  pro  $10^6$  Zellen) aufgenommen und in die Mäuse injiziert.

Um die Tumorigenität der in Kultur gehaltenen, Mef2c- beziehungsweise eGFP-überexprimierenden M/E-Zellen zu testen, wurden  $1 \times 10^6$  dieser Zellen pro Maus intraperitoneal in nicht bestrahlte NOD/*scid* Mäuse injiziert. Die Vorbereitung erfolgte in gleicher Weise wie oben beschrieben.

#### 4.2.10 Cobblestone-Formations-Assay

Der Cobblestone-Formations-Assay dient dazu, die Kapazität früher hämatopoetischer Zellen eine Stromazelllinie zu unterwandern, zu testen. Hierzu wurde zunächst die Stromazelllinie MS-5 mit einer Konfluenz von 80 bis 90% ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte in nicht beschichteten 6-Loch-Platten in DMEM mit 10% FCS. Bevor die zu testenden M/E-Zelllinien auf die MS-5 Zellen gesät werden konnten, mussten Letztere bestrahlt werden (117 Gy, 90 Minuten), so dass ihre Proliferation unterbunden war und die MS-5 Zellen als Einzelzellschicht vorlagen. 24 Stunden nachdem  $1 \times 10^6$  M/E/gfp beziehungsweise M/E/Mef2c pro Vertiefung auf die MS-5 Zellen gegeben wurden, erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskops.

#### 4.2.11 Quantitative Migrationsversuche *in vitro*

Zur *in vitro* Quantifizierung der Migrationskapazität von Zellen werden Transmigrations-Platten genutzt. Diese bestehen aus einer oberen Kammer, in der die Zellen in ihrem Kultivierungsmedium in einer definierten Zellzahl ausplattiert werden können und einer unteren Kammer, in der dem Kultivierungsmedium ein sogenanntes Chemoattrakt zugesetzt wird. Die beiden Kammern sind durch eine Membran mit auszuwählender Porengröße voneinander getrennt, so dass die Zellen aus der oberen Kammer in die untere Kammer migrieren können. Die Migration erfolgt um so effektiver, je besser die Zellen auf das angewendete Chemoattrakt reagieren.

Um die Migrationskapazität der Mef2c exprimierenden mit den Mef2c-defizienten M/E-Zellen zu vergleichen, wurden jeweils 1 bis  $2 \times 10^5$  Zellen in der oberen Kammer einer Transmigrations-24-Lochplatte mit  $5 \mu\text{m}$  Porendurchmesser der Membran (Costar, Corning, NY) ausplattiert. Das Kultivierungsmedium der unteren Kammer wurde mit  $100 \text{ ng/ml}$  SDF1 $\alpha$  supplementiert und es erfolgte eine Inkubation der Ansätze bei  $37^\circ\text{C}$  für drei bis fünf Stunden bevor die Zahl der in die untere Kammer migrierten Zellen mit Hilfe einer Neubauer

Zählkammer bestimmt wurde. Alle Ansätze erfolgten als Triplikate in drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.12 Stimulation von Zellen mit Lipopolysaccharid

Zur Induktion einer intrazellulären Signalkaskade, die zur Aktivierung von Mef2c über den p38-Mitogen-Aktivierte-Phosphorylierungs-Kinase (MAPK)-Weg führt, wurde das natürlicherweise in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien vorkommende Lipopolysaccharid (LPS L2654; Sigma Taufkirchen) verwendet. Dazu wurden  $1 \times 10^7$  FDCCP-1/gfp beziehungsweise FDCCP-1/Mef2c exprimierende Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit jeweils 10 ng/ml LPS für 1 h stimuliert. Die so behandelten Zellen wurden in vorgekühlte 15 ml Röhrchen geerntet und durch Zentrifugation (5 min, 300 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets entweder sofort zur Protein- oder RNA-Isolation verwendet oder bei  $-70^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.2.13 Vorbereitung von M/E/iPac beziehungsweise /Mef2c<sup>ASR</sup> für Microarray-Analyse

Um ein vergleichendes Genexpressions-Profil von Mef2c-exprimierenden und nicht-exprimierenden MLL/ENL-transformierten Zellen zu erhalten, wurde eine Microarray-Analyse von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Hierzu wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen etwa  $1 \times 10^6$  kultivierte Zellen durch Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße geerntet. So sollte eine möglichst durchschnittliche Genexpression gewährleistet werden, da es sich um eine Mischung aus frisch gefütterten, 24 und 48 Stunden nicht-gefütterten Zellen handelt. Die Zellpellets wurden zunächst jeweils einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Versand an Miltenyi Biotec bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die RNA-Isolation und das Poolen der isolierten RNA erfolgte bei Miltenyi Biotec. Für die Hybridisierung wurde ein „Agilent Whole Mouse Genome Microarray 4x44K one color (Cy3) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der „DAVID Bioinformatics Database“ Plattform unter <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>. Signifikant deregulierte Gene wurden durch real time PCR verifiziert (siehe Abschnitt 4.2.18.4 und Tabelle 3).

#### 4.2.14 Mausmodell

##### 4.2.14.1 Induktion der Exzision von Exon 2 in Mef2c konditionalen knock-out Mäusen

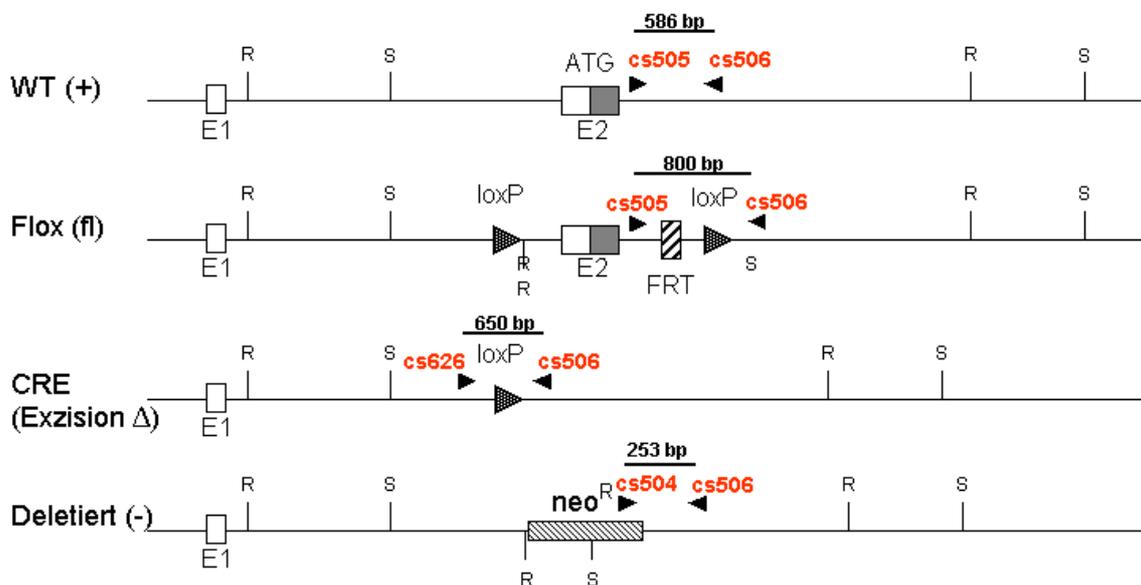
Neugeborene Mäuse aus Verpaarungen von heterozygoten *Mef2c*<sup>-/wt</sup> x MxCreB6 mit *Mef2c*<sup>fl/wt</sup> x MxCreB6 Tieren wurden innerhalb von 24 bis 72 h nach der Geburt mit einer einmaligen Dosis von 500 µg/ml polyIC intraperitoneal mit einer 27G x 3/4“ Kanüle injiziert.

Die Tiere wurden nach 21 Tagen von den Müttern abgesetzt und genotypisiert.

#### 4.2.14.2 Identifikation transgener Mäuse

Zur Genotypisierung der Nachkommen wurde den Tieren 3 Wochen nach der Geburt unter Betäubung mit einem sterilen Skalpell etwa 4 mm Schwanz entfernt und die Wunde verödet.

Die Aufreinigung der Schwanzbiopsien erfolgte nach der Methode von <sup>81</sup>Laird *et al.*, 1991. Anschließend wurde mit 1 µl der aufgereinigten DNA eine Standard-PCR mit den Primern CS 504, CS 505 und CS 506 (binden an das gefloxt beziehungsweise an das Wiltyp-Allel von *Mef2c*, Abbildung 6) und den Primern CS 282 und CS 283 (Nachweis des *Cre*-Allels, nicht abgebildet) durchgeführt. Tieren, in denen potenziell eine Exzision des *Mef2c* Allels nach polyIC Injektion stattgefunden haben kann (*Mef2c<sup>fl/-</sup>; Cre<sup>+</sup>*), wird nach etwa sechs weiteren Wochen retrobulbär Blut entnommen. Es erfolgt eine Aufreinigung der DNA mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden) zum Einsatz in einer Standard-PCR mit den Primern CS 504, CS 505, CS 506 und CS 625 (Abbildung 6). Die *Mef2c<sup>Δ/-</sup>* Tiere zeigen mit der Primerkombination CS626 und CS506 eine 650 bp große Bande in der PCR.



**Abbildung 6: Bindungsstellen der Primer und entsprechende Fragmentgrößen zur Genotypisierung der *Mef2c* konditionalen knock-out Mäuse.** WT, Bindung der Primer CS505/CS506 amplifiziert 586 bp Fragment; Flox (fl) Bindung der Primer CS505/CS506 amplifiziert 800 bp Fragment, inklusive Flox-Allel; CRE, Bindung der Primer CS626/CS506 amplifiziert 650 bp Fragment, nach Exzision des Flox-Allels; Deletiert, Bindung der Primer CS504/CS506 amplifiziert 253 bp Fragment, Deletiertes *Mef2c*-Allel.

**Tabelle 4:** Name und Sequenzen der Primer zur Genotypisierung der Mef2c konditionalen knock-out Mäuse.

Primernamen	Sequenz (5'-3')
CS282	ggt gaa cgt gca aaa cag gct cta
CS283	gct tgc atg atc tcc ggt att gaa
CS504	gtg ggc tct atg gct tct gag gcg gaa ag
CS505	gtg atg acc cat atg gga tct aga aat caa ggt cca ggg tca g
CS506	cta ctt gtc cca aga aag gac agg aaa tgc aaa aat gag gca g
CS626	tgt ggg att tgt agg aaa ggg att atg g

#### 4.2.15 Quantitative Migrationsversuche *in vivo*

Um die Homingkapazität von Mef2c-exprimierenden mit derer der Mef2-defizienten Knochenmarkzellen vergleichen zu können wurde zunächst Knochenmark aus *Mef2c<sup>+/+</sup>* bzw. *Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Mäusen isoliert und mit dem Vybrandt CFDA-SE Cell Tracer Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Etwa eine Stunde vor Injektion dieser Zellen wurden Empfängermause (C57Bl/6-Ly5.1) lethal bestrahlt. Pro Empfängermaus wurden  $1 \times 10^7$  CFDA-SE gefärbte Zellen intra venös in die Schwanzvene injiziert. Nach vier Stunden wurden die Mäuse zur Entnahme der Milzen und des Knochenmarks abgetötet. Die Organe wurden wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet, wobei CFDA-SE positive Zellen im FITC-Kanal des FACS Canto detektiert wurden.

#### 4.2.16 Analyse erkrankter Tiere

Tiere, die mit retroviral veränderten Knochenmarkzellen transplantiert waren, erhielten ab dem Tag der Transplantation über einen Zeitraum von zwei Wochen Wasser, dem 2,5 µg/ml Baytril (Bayer, Leverkusen) zugesetzt war. Es erfolgte eine regelmäßige Untersuchung der Tiere auf Krankheitszeichen wie buckelige Haltung, Hecheln/Atemnot, struppiges Fell, Blutarmut, oder das Auftreten vergrößerter Organe. Tiere mit eindeutigen Krankheitssymptomen wurden zunächst mit Ether betäubt, so dass eine retrobulbäre Blutentnahme in ein EDTA-enhaltendes Kapillarröhrchen vorgenommen werden konnte. Anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet.

Die getötete Maus wird durch äußeres Besprühen mit Ethanol semisterilisiert. Die Obduktion und Organentnahme beginnt mit Öffnen der Dermis und Freilegung des Halses, Thorax und Peritoneums. Hierbei können die peripheren, axialen und cervikalen Lymphknoten gut beurteilt werden. Nach Öffnung des Peritoneums kann der Darm und an ihm die mesenterialen Lymphknoten untersucht und gegebenenfalls zur weiteren Analyse entnommen werden. Anschließend werden Milz, Nieren, Leber sowie die lumbalen Lymphknoten untersucht. Sollte eine FACS-Analyse erfolgen, wurde das entnommene

Organ in 5 ml IMDM-Medium aufbewahrt und aufbereitet. Sollte aus dem Organ DNA, RNA oder Protein isoliert werden, wurde das Organ in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Öffnung des Thorax wurden Herz, Lunge und Thymus sowie die mediastinalen und thymusassoziierten Lymphknoten untersucht und gegebenenfalls gewogen und schockgefroren oder zur FACS-Analyse genutzt. Zur Knochenmarkisolierung werden die Ober- und Unterschenkel der Mäuse präpariert und das Knochenmark wie oben beschrieben, isoliert. Für eine spätere histologische Aufarbeitung des Knochenmarks wird das Sternum entnommen und in 4 ml Calfix-Lösung (Protaqs Calfix, Quaratett) bei 4°C aufbewahrt. Die Kadaver der getöteten Mäuse werden zentral entsorgt.

#### 4.2.16.1 Analyse der Blutparameter

May-Grünwald Lösung	0,25% (w/v) May-Grünwald in Methanol
Giemsa Lösung	0,4% (w/v) Giemsa-Stammlösung (Sigma, Taufkirchen)

Zur morphologischen Auswertung des entnommenen Blutes wurden pro Tier zwei Blutausrichungen mit jeweils 2 µl Blut hergestellt. Das Blut wurde auf einen Objektträger (Roth, Karlsruhe) pipettiert und mit einem im 45° Grad Winkel gehaltenen zweiten Objektträger entlang der Längsachse gleichmäßig ausgestrichen. Die Ausstriche wurden vor der Färbung über Nacht getrocknet. Die erste Färbung der Objektträger erfolgte für 5 Minuten in May-Grünwald Lösung, die anschließend mit deionisiertem Wasser gründlich abgewaschen wurde. Für den zweiten Färbeschritt wurde 1:20 verdünnte Giemsa Lösung für 20 Minuten appliziert, die danach ebenfalls mit deionisiertem Wasser gründlich abgewaschen wurde. Die Präparate wurden getrocknet und dann mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop.

Zur Bestimmung des zellulären Anteils am Volumen des Blutes (Hämatokritwert) wurden Hämatokritröhrchen mit Blut gefüllt, verschlossen und bei 11.000 rpm (Biofuge Haemo, Heraeus, Langenselbold) für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert mit Hilfe einer Hämatokritschablone abgelesen.

Die Leukozytenzahl wurde nach Lyse der Erythrozyten mit Essigsäure bestimmt. Dazu wurde das Blut im Verhältnis 1:20 mit 3%iger Essigsäure verdünnt und die Leukozyten in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

#### 4.2.16.2 Vorbereitung der Organe zur durchflusszytometrischen Analyse

Die bei der Präparation entnommenen Organe wurden innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Die Vereinzelung der Zellen eines Organs erfolgte durch Drücken des Organs mit Hilfe des Stempels einer Spritze und mehrmaliges Nachspülen mit Kulturmedium durch ein Drahtsieb mit 160 µm Maschenweite. Bevor die Zellzahl bestimmt werden konnte

erfolgte eine Lyse der Erythrozyten (PharMLyse, BD PharMingen). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 1 x PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für die Antikörperfärbung wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in einem Volumen von 200 bis 300  $\mu\text{l}$  1 x PBS, 0,5% FCS aufgenommen. Um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden erfolgte eine zehnmünütige Vorinkubation der Zellen mit 1,5  $\mu\text{l}$  Fc-Block (Anti-CD16/32; Klon 93; BioLegend) bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{l}$  PE- beziehungsweise 1,5  $\mu\text{l}$  APC-konjugierten Antikörpern für mindestens 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden die Ansätze mit 1 x PBS auf 1,5 ml aufgefüllt und 5 Minuten bei 300 x g (RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment anschließend in 200  $\mu\text{l}$  1 x PBS aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension durchflusszytometrisch analysiert.

#### **4.2.16.3 Histologische Methoden**

Alle histologischen Analysen wurden freundlicherweise im Labor von Dr. J. Löhler von Gundula Pilnitz-Stolze durchgeführt. Die folgenden Arbeitsanleitungen geben nur die Prinzipien der jeweiligen histologischen Aufbereitung beziehungsweise Markierung und Detektion der nachzuweisenden Gewebestrukturen und/oder Proteine wieder.

Die für histologische Untersuchungen entnommenen Lebern der transplantierten Mäuse wurden in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Vor der Einbettung in Paraffin werden die Lebern zunächst gewässert, dann in Einweg-Einbettkassetten (DiaPath, München) überführt und mit 55%igem Ethanol behandelt. Anschließend erfolgt eine automatisierte, stufenweise Entwässerung (Vakuumgewebeeinfiltrationsautomat Leica ASP300) und Einbettung der Organe in Paraffin mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (EG1160, Leica). Mittels eines Mikrotoms werden 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost/Plus Objektträger (Assistent, Sodenheim) überführt. Es folgt ein Trocknungsschritt über Nacht bei 37°C bevor die Anfärbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin/Eosin folgt.

#### **4.2.17 Nukleinsäure-analytische Methoden**

##### **4.2.17.1 Standardmethoden**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen, die Präzipitation von Nukleinsäuren mittels Ethanol sowie die Auftrennung entsprechend ihrer Größe durch Agarose-Gelelektrophorese sind Standardmethoden (<sup>80</sup>Sambrook und Russell, 2000), die hier nicht detailliert beschrieben werden sollen.

##### **4.2.17.2 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA**

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse.

Für die Präparation im großen Maßstab wurde das Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Pufferlösungen dieses Kits dienten auch der Präparation im kleinen Maßstab. Hierfür wurden 1,5 ml einer Bakterienkultur bei 5.900 x g (1 min, RT) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2 Puffer wurde die Lösung durch Invertieren gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl kaltem P3 Puffer und erneutes Invertieren. Die ausgefallenen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, RT, 16.200 x g) sedimentiert und der Überstand durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine anschließende Ethanol-Fällung gereinigt. Die sedimentierte und getrocknete DNA wurde in 50 µl Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) suspendiert.

#### **4.2.17.3 Isolation von RNA**

##### **4.2.17.3 a) Isolation von RNA aus Milzen**

Cäsiumchlorid-Puffer	5,7 M CsCl, 25 mM Natriumacetat; in DEPC-H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% Diethylpyrocarbonat in H <sub>2</sub> O, 12 h 37°C, dann autoklaviert
GIT-Puffer	4 M Guanidin-Isothiocyanat, 25 mM Natriumacetat in DEPC-H <sub>2</sub> O; vor Gebrauch Zugabe von 2-Mercaptoethanol (120 mM)

Die Isolation von RNA erfolgte aus schockgefrorenen und bei -70°C gelagerten Milzen. 300 mg des Gewebes wurden in 3 ml gekühltem GIT-Puffer durch Ultraschall mittels des Sonifiers B12 (Branso Sonic Power Company, Danbury, USA) auf Stufe 6 für 30 Sekunden zerkleinert. Dadurch wurden die Zellwände zerstört und die zelluläre DNA fragmentiert. Das Probengefäß wurde während der Behandlung auf Eis gekühlt. Vor Zerkleinerung der nächsten Probe erfolgte die Reinigung der Geräteteile mit Probenkontakt zunächst mit 0,1% SDS, gefolgt von Wasser, Ethanol und GIT-Puffer. Die Gewebesuspension wurde vorsichtig auf ein Kissen aus 1,2 ml Cäsiumchlorid-Puffer in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (11 x 60 mm, Beckman Coulter, Krefeld) geschichtet. Während der Zentrifugation bei 121.000 x g bei 20°C über Nacht (SW 60 Rotor) bildete sich ein Dichtegradient, in dem die RNA sedimentierte, während genomische DNA und Proteine sich weiter oben im Gradienten befanden. Der Protein- und DNA-haltige Überstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen erneut mit 100 µl DEPC-Wasser ausgespült um RNA-Reste zu lösen, die ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert wurden. Nach einer Ethanol-Präzipitation mit Hilfe 1/10 Volumens 3 M Natriumacetat (pH 6,0) wurde

das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die Quantität und Reinheit mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Außerdem wurde die Qualität durch Analyse von 1 µg RNA auf einem Agarose-Gel überprüft. Bei guter Qualität sind nach der Elektrophorese zwei Banden ribosomaler RNA (28 S und 18 S) sichtbar. Das Verhältnis 28 S : 18 S ist dann 2:1.

#### **4.2.17.3 b) Isolation von RNA aus Suspensionszellen**

Die Isolation von RNA aus Suspensionszellen erfolgte mit Hilfe des PeqGOLD Trifast Kits (PeqLab Biotechnology, Erlangen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde vor der Übersetzung in cDNA mit DNaseI behandelt um eventuell fälschlich isolierte DNA zu entfernen. Hierzu wurde das RNAaqueous-4PCR Kit (Ambion, Austin Texas, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt.

#### **4.2.17.4 Reverse Transkription**

Zur Übersetzung der zellulären RNA-Transkripte in cDNA wurde 1 µg der isolierten RNA in eine reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Diese erfolgte mit der AMV Reversen Transkriptase nach Herstellerprotokoll unter Verwendung von Oligo-dT Primern.

#### **4.2.18 PCR und Sequenzierung**

##### **4.2.18.1 PCR**

Die spezifische Amplifikation von cDNA erfolgte durch die PCR-Methode (<sup>82</sup>Saiki *et al.*, 1988). Die Standard-PCR in einem Volumen von 35 µl fand unter folgenden Bedingungen mit den Komponenten des *Taq* Polymerase Core Kits statt:

1 x PCR-Puffer  
0,2 mM dNTP Mix  
100 ng Primer 1  
100 ng Primer 2  
0,04 U/µl *Taq* Polymerase

Als Ausgangs-DNA wurden 2 µl cDNA (übersetzt aus 1 µg RNA) verwendet. Das PCR-Programm wurde ausgehend vom Standardprogramm (initiale Denaturierung (5 min, 95°C), 35 Zyklen Denaturierung (30 sec, 95°C), Annealing (30 sec, primer-spezifische Annealingtemperatur) und Elongation (30 bis 90 sec, 72°C), gefolgt von einer finalen Elongation (5 min, 72°C)) optimiert.

#### 4.2.18.2 Ortsspezifische Mutagenese durch PCR

Die ortsspezifische Mutagenese dient der gezielten Veränderung eines Gens durch Austausch einzelner Basenpaare. Mit Hilfe dieser PCR-basierten Methode wurde für diese Arbeit eine mutierte Form des Mef2c-Gens hergestellt, in der die Bindungsstelle für die Histondeacetylase 4 (HDAC4) mutiert ist (Aminosäuren 65 Valin, 66 Valin und 67 Leucin in Alanin, Serin und Asparagin; <sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000). Die gezielte Mutation erfolgte mit Hilfe speziell entworfener komplementärer Oligonukleotide (CS 885 und CS 886), die die gewünschten veränderten Basen (kursiv geschrieben, siehe unten), flankiert von je 21 weiteren Basen in sowohl 5' als auch 3' Richtung, aufweisen. Ausgehend von diesen beiden Oligonukleotiden konnte der gammaretrovirale Vektor R1350 (pMYs-Mef2c) vollständig kopiert werden. Da bei dieser Art der PCR sehr große Produkte (bis 18 kb, hier 7,5 kb) entstehen, die keine weiteren Mutationen aufweisen dürfen, ist es von großer Bedeutung eine Pfu-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease Aktivität einzusetzen.

PCR Ansatz und Bedingungen: 15 ng R 1350

1 x Pfu Ultra Puffer

0,3 µM CS 885

0,3 µM CS 886

0,2 mM dNTPs

2,5 U/µl Pfu Ultra High Fidelity DNA Polymerase

x µl H<sub>2</sub>O (Endvolumen 50 µl)

CS 885: 5'-cca gca ctg aca tgg ata agg cgt cgc gca agt aca ccg agt aca acg a-3'

CS 886: 5'-tcg ttg tac tcg gtg tac ttg cgc gac gcc tta tcc atg tca gtg ctg g-3'

Die initiale Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C wird gefolgt von 20 Zyklen Denaturierung bei 95°C für je 30 Sekunden, Primeranlagerung bei 60°C für 1 Minute und Elongation bei 68°C für 15 Minuten. Nach Ablauf der 20 Zyklen folgt eine letzte Elongationsphase von 5 Minuten bei 72°C um angefangene Kopien fertig zu stellen. Der PCR-Schritt wird gefolgt von einer Inkubation mit 10 Einheiten des bakteriellen Enzyms DpnI für eine Stunde bei 37°C. Dies dient dem Abbau des „Mutterstrangs“, der aufgrund von Methylierungen durch Replikation in einem entsprechenden Bakterienstamm vor der Präparation, erkannt wird. So kann sichergestellt werden, dass eine erfolgreiche Transformation von 5 µl des Mutagenese-PCR-Ansatzes zur Expression des veränderten Plasmids in den bakteriellen Kolonien führt. Zur Verifikation erfolgte nach Aufreinigung der Plasmid-DNA eine Sequenzierung.

#### 4.2.18.3 Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (<sup>84</sup>Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines kommerziellen Kits sequenziert. In einem Ansatz von 20 µl wurden 800 ng DNA, 3 µl BigDye und 15 pmol Primer vermischt. Die Ansätze wurden im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert: initiale Denaturierung für 1 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung für je 30 sec bei 95°C, Primeranlagerung für 15 Sekunden bei 50°C und Elongation für 4 Minuten bei 60°C. Der Reaktionsansatz wurde durch Ethanol-Präzipitation gefällt, das Pellet getrocknet und im Sequenzierservicelabor (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) analysiert.

#### 4.2.18.4 *real-time* PCR

Mit der *real-time* PCR kann die relative Menge spezifischer Transkripte in verschiedenen Proben gemessen und miteinander verglichen werden. Für diese Arbeit wurden Amplifikate mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green detektiert. Dieser kann sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagern und nach der Einlagerung ein starkes Fluoreszenzsignal emittieren. Nimmt die DNA-Menge während der Amplifikation zu, steigt damit auch das Fluoreszenzsignal. Während der *real-time* PCR wird in jedem Zyklus der PCR das Fluoreszenzsignal bestimmt und damit auch der Anstieg des Signals detektiert, wenn die Amplifikatmenge steigt. Durch den CT-Wert (*Threshold Cycle*) wird der Zyklus angegeben, in dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt. Je mehr Ausgangsmaterial eines spezifischen Transkripts vorhanden ist, desto früher findet der Anstieg der Fluoreszenz über den Detektionslevel statt und desto geringer ist damit der CT-Wert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wird eine Probe für alle Messreihen als Kalibrator festgelegt, zu dem alle Proben in Verhältnis gesetzt werden. Dadurch werden Schwankungen zwischen den verschiedenen Läufen egalisiert, die zum Beispiel durch Pipettierfehler beim Master Mix zustande kommen. Da die Ausgangsmengen an eingesetzter cDNA schwanken können, wird für alle Proben der CT-Wert eines Referenzgens bestimmt, das in allen Zellen gleich exprimiert wird (*housekeeping gene*) und mit der selben Effizienz amplifiziert wird. Die CT-Werte des zu bestimmenden Gens jeder Probe werden in Verhältnis zum Referenzgen gesetzt, um die Proben untereinander vergleichbar zu machen. Daraus ergibt sich für die Quantifizierung nach der Kalibratornormalisierten Methode folgende Formel:

$$\text{normalisiertes Ergebnis} = \frac{\text{Konz. Zielgen}(\text{Probe})}{\text{Konz. Referenzgen}(\text{Probe})} \times \frac{\text{Konz. Referenzgen}(\text{Kalibrator})}{\text{Konz. Zielgen}(\text{Kalibrator})}$$

Für diese Arbeit wurden die relativen Transkriptmengen von *Mef2c*, *c-jun*, *Pu.1* und *C/ebpa* in Milzen transplanteder Mäuse bestimmt. Weiterhin wurden die relativen Transkriptmengen der Gene *Cxcr4*, *Ccr2*, *Ccr5*, *Ccl6*, *Mmp8*, *Mmp12* und *Mmp25* in der transformierten M/E-Zelllinie, infiziert mit pMYs-iPac oder pMYs-Mef2c<sup>ASR</sup>, bestimmt.

Letzteres diente der Verifizierung der durch Miltenyi Biotec ermittelten Microarray Daten dieser Zelllinien. Als Referenzgen diente in beiden Fällen das Gen für die Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (*Hprt*). Die Amplifikation der Proben erfolgte in zwei unabhängigen Läufen jeweils als Duplikat. Die Bedingungen und Oligonukleotid Sequenzen für die einzelnen PCR-Läufe sind Tabelle 1 zu entnehmen. Für die relative Quantifizierung wurde oben beschriebene Formel angewandt.

#### **4.2.19 Proteinbiochemische Methoden**

##### **4.2.19.1 Western-Blot-Analysen**

###### **4.2.19.1 a) Zellyse und Probenaufbereitung**

In dieser Arbeit wurde die Expression spezifischer Proteine in FDCEP-1- und M/E-Zellen, sowie in den Milzen transplanteder Mäuse untersucht. Um die während der Proteinisolation freigesetzten Proteasen möglichst inaktiv zu halten, erfolgte die Zellyse mit saurer 10%iger TCA-Lösung, die neben dem Zellaufschluss auch eine sofortige Denaturierung und Fällung der freigesetzten Proteine bewirkt. Weiterhin erfolgten alle Isolationsschritte auf Eis.

0,1 bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 500  $\mu$ l 10%iger TCA-Lösung suspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Ansätze bei 13 000 x g und 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das gefällte Proteinpellet je nach Größe in 100 – 140  $\mu$ l 2 x SDS-Probenpuffer/1M Tris im Verhältnis 7:3 aufgenommen. Zur Lösung des Proteinpellets folgten ein bis zwei etwa 10 sekundige Sonifizierungsschritte (40% Power) auf Eis.

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinlysate wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Dazu wurden die Lysate zunächst 1:10 in 2 x SDS-Probenpuffer verdünnt und anschließend mit dem BioRad DC-Protein Assay nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration konnte durch das Mitführen einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration berechnet werden. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in 2 x SDS-Probenpuffer benutzt, die insgesamt acht Proteinkonzentrationen von 0 bis 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l beinhaltete. Bevor das Proteingemisch mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt werden konnte, wurde das einer Proteinkonzentration von 50  $\mu$ g entsprechende Volumen mit einer 1:3 Mischung aus Dithiothreitol (DTT; zur Oxidation von Disulfidbrücken und weiterer Denaturierung der Proteine) und 3 x SDS-Probenpuffer für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht.

#### **4.2.19.1 b) SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE dient der Trennung von Proteingemischen nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht. Zur Herstellung von SDS-Minigelen (100 mm x 80 mm x 1 mm) wurde das Protean II-System von BioRad (München) verwendet. In den Gelen wurden 50 µg Proteingemisch aufgetrennt. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde ein gefärbter Größenstandard (low range SDS-PAGE Standard, BioRad, München) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für etwa 1 ½ Stunden.

#### **4.2.19.1 c) Western-Blot und immunologische Detektion**

Proteine können nach ihrer größenabhängigen Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Membran spezifisch durch zwei sukzessive Antikörperbindungsschritte detektiert werden. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Tankblot-Verfahren (Mini-Trans Blot Cell, Biorad, München) in 60 Minuten bei konstanten 100 V unter Eiskühlung auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Dazu wurde die Membran kurz mit Methanol aktiviert und nach Abspülen mit deionisiertem Wasser in Blot-Puffer äquilibriert. Nach dem Blot wurde die Membran auf dem Schwenktisch für 45 Minuten in Block-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit den spezifischen primären Antikörpern (siehe Tabelle 1, Material) erfolgte bei 4°C über Nacht. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS-Tween gewaschen und danach 60 Minuten mit dem zur Bindung an den Erstantikörper geeigneten sekundären, peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper erfolgten drei weitere Waschschrte, analog zu den oben beschriebenen. Spezifische Antikörperinteraktionen wurden dann in der „enhanced chemiluminescence (ECL)-Reaktion nach Angaben des Herstellers (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) detektiert.

Zur Weiterverwendung der Membran wurde diese erneut in TBS-Tween gewaschen und vor Zugabe eines neuen primären Antikörpers für mindestens 30 Minuten in Block-Puffer inkubiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Ist Mef2c ein Zielgen von MLL/ENL im Kontext der leukämischen Transformation?

Als Grundlage für den ersten Teil dieser Arbeit dient die gesamtgenomische Expressionsanalyse (Microarray) von 285 Proben von Patienten, die an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt sind. Mit Hilfe des Microarrays wurde in drei distinkten Gruppen (Patienten mit ähnlichem Genexpressionsprofil) eine Hochregulation des MADS-box Transkriptionsfaktors *MEF2C* identifiziert (Gruppe 1, 10 und 16; Abb. 4, Einleitung). Ein Teil der Patienten der Gruppen 1 und 16 tragen zusätzlich eine Translokation des *Mixed-Lineage-Leukemia (MLL)*-Gens und die Leukämien der Patienten aller drei Gruppen weisen einen monozytären Phänotyp der leukämischen Zellen auf.

#### 5.1.1 Mef2c ist nicht wichtig für die Etablierung und Erhaltung einer mit M/E transformierten Zelllinie

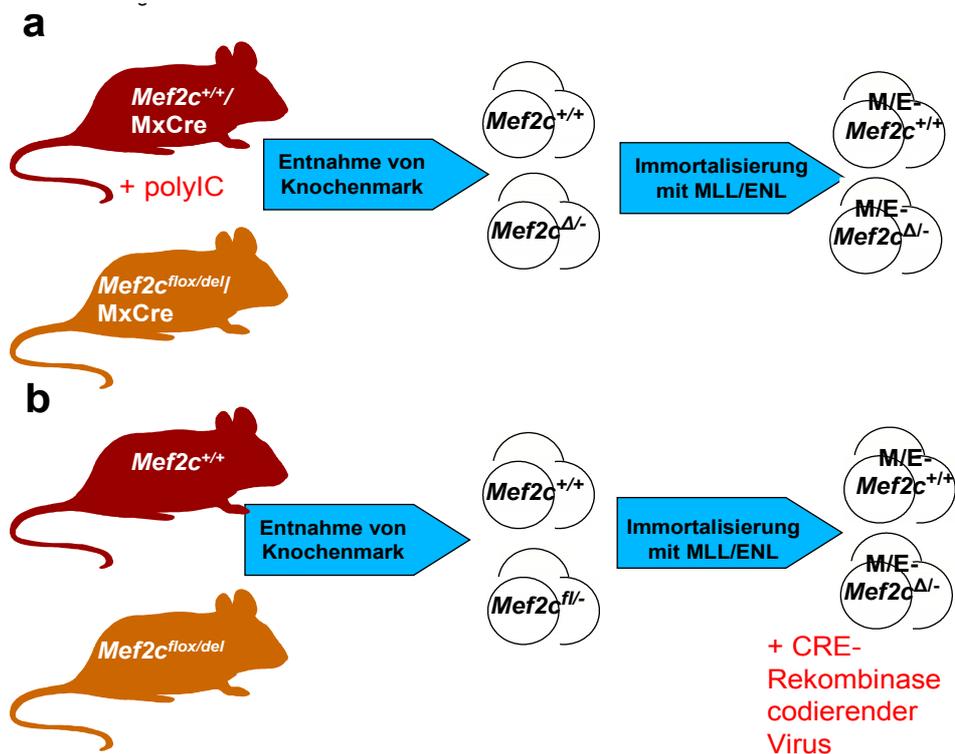
Um die Rolle von Mef2c in MLL/ENL transformierten leukämischen Stammzellen (LSZ) zu untersuchen, wurde für die folgenden Versuche Knochenmark aus einem konditionalen *Mef2c*-Mausstamm benutzt (<sup>67</sup>Lin *et al.*, 1997; <sup>70</sup>Arnold *et al.*, 2007). Diese C57Bl/6-Mäuse tragen neben einem deletierten *Mef2c*-Allel ein *Mef2c*-Allel, in dem das Exon 2 durch loxP-Sequenzen flankiert ist (siehe Abbildung 6, Material und Methoden). Durch Induktion einer CRE-Rekombinase wird das loxP-flankierte Exon herausgeschnitten und es wird ein inaktives Protein translatiert, das nicht mehr an die DNA binden kann.

In zwei unterschiedlichen Ansätzen wurde zunächst untersucht, ob die Expression von Mef2c wichtig ist, um *in vitro* eine durch MLL/ENL(M/E)-transformierte Zelllinie herzustellen. Dazu wurden zunächst Mef2c-defiziente Knochenmarkszellen aus den konditionalen *Mef2c*-knockout Mäusen isoliert und die Linien-negativen Vorläuferzellen angereichert. Im Knochenmark dieser Tiere ist das gefloxtete Mef2c-Allel bereits herausgeschnitten; nach Verpaarung der C57Bl/6-*Mef2c*<sup>fl/-</sup> (B6-*Mef2c*<sup>fl/-</sup>)-Mäuse mit dem MxCRE-Mausstamm wird in den neugeborenen Nachkommen die CRE-Rekombinase durch Injektion von polyIC induziert (Abb. 7 a). Als Kontrolle diente Knochenmark aus *Mef2c*-Wildtyp(B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>)/MxCRE Geschwistermäusen. Es folgte eine Infektion dieser Zellen mit MLL/ENL-eGFP codierenden retroviralen Pseudotypen. Die Expression von MLL/ENL in Verbindung mit dem Reportergen *eGFP* ermöglicht die Identifizierung der erfolgreich infizierten Zellen im FACS; *eGFP* codiert für das grüne fluoreszierende Protein (eGFP) aus der Königsqualle (*Aequorea victoria*). Das Protein wird in der Zelle zytoplasmatisch exprimiert und emittiert nach Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht ein grünes Licht der Wellenlänge 520 nm. Es wirkt nicht toxisch für die Zellen und wird stabil exprimiert. Bereits

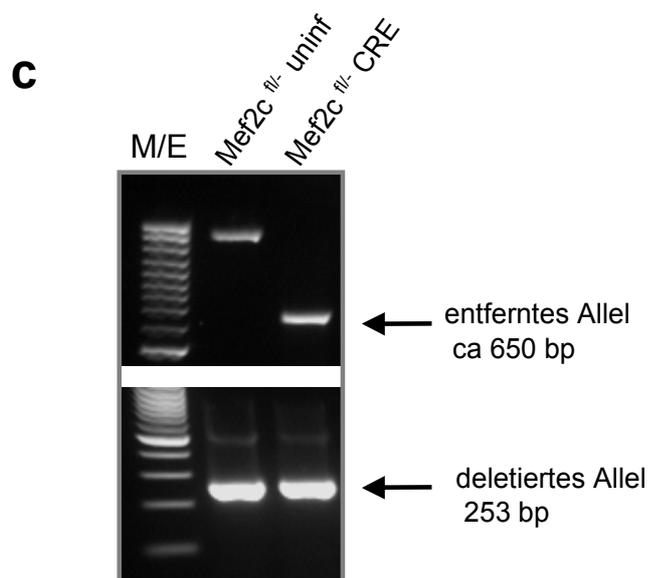
eine Woche nach Infektion der B6-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>- und B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Knochenmarkzellen mit MLL/ENL-eGFP-codierenden Pseudotypen exprimierten alle Zellen dieser Kulturen das Markergen *eGFP*, wodurch auf eine vollständige *in vitro* Immortalisierung durch MLL/ENL geschlossen werden konnte. Somit wurde gezeigt, dass die Expression von *Mef2c* nicht wichtig für die Etablierung einer M/E-transformierten Knochenmarkzelllinie ist.

In einem zweiten Ansatz wurde Knochenmark aus B6-*Mef2c*<sup>fl/-</sup> und B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Mäusen entnommen, in denen das gefloxtete *Mef2c*-Allel noch nicht herausgeschnitten war (Abb. 7 b). Auch diese Zellen wurden zunächst auf frühe, Linien-negative Vorläuferzellen sortiert. Im Anschluss erfolgte die Infektion der Knochenmarkzellen mit für das Fusionsprotein MLL/ENL-neo codierenden retroviralen Pseudotypen (Abb. 7 b). In diesem Konstrukt wird MLL/ENL in Verbindung mit einem Gen exprimiert, dessen Produkt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Neomycin vermittelt. Auch in diesem Versuchsansatz wurde die erfolgreiche *in vitro* Immortalisierung durch MLL/ENL innerhalb einer Woche durch Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum nachgewiesen. Erst im Anschluss daran erfolgte die Exzision des gefloxteten *Mef2c*-Allels durch Transduktion der M/E-Zellen mit retroviralen Pseudotypen, die die CRE-Rekombinase in Verbindung mit dem Markergen *eGFP* codieren. Die erfolgreich transduzierten M/E-*Mef2c*<sup>fl/-</sup>- und M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen unterschieden sich phänotypisch nicht und wurden anhand ihrer *eGFP*-Expression für die weiteren Versuche sortiert (Abb. 7 b). Da die Exzision von *Mef2c* nach der Immortalisierung der Knochenmarkzellen durch MLL/ENL keinen Einfluss auf deren Phänotyp hatte, konnte gezeigt werden, dass die *Mef2c*-Expression keine Rolle für die Erhaltung der M/E-immortalisierten Knochenmarkzelllinie spielt.

Die erfolgreiche Entfernung des gefloxteten *Mef2c*-Allels wurde in den M/E-Zelllinien, die aus den beiden unterschiedlichen Ansätzen hervorgegangen waren durch PCR bestätigt. Dies ist in Abbildung 7 c beispielhaft dargestellt.



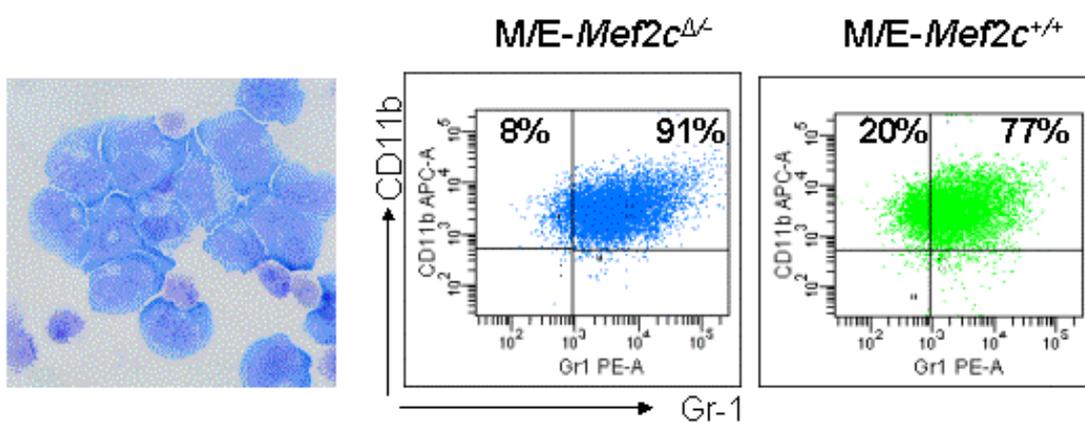
**Abbildung 7: Ansätze zur Etablierung der M/E-Zelllinien.** (a) Entnahme von Knochenmark aus konditionalen C57Bl/6-*Mef2c<sup>+/+</sup>/MxCre* beziehungsweise *-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/MxCre* Mäusen und anschließende Infektion mit zur MLL/ENL-Expression manipulierten gammaretroviralen Pseudotypen zur Immortalisierung. (b) Entnahme von Knochenmark aus konditionalen C57Bl/6-*Mef2c<sup>+/+</sup>*- beziehungsweise *Mef2c<sup>flox/del</sup>*-Mäusen und anschließende Immortalisierung durch MLL/ENL. Die Exzision des *Mef2c*-flox Allels erfolgte nach der Immortalisierung durch Infektion mit zur CRE-Rekombinase-Expression manipulierten gammaretroviralen Pseudotypen. (c) Überprüfung der Exzision des geflochten Exon2 von *Mef2c* durch PCR; das durch die CRE-Aktivität veränderte Allel resultierte in einer 650 bp Bande.



Zur weiteren Charakterisierung der M/E-transformierten *Mef2c<sup>Δ/-</sup>*-Zellen verglichen mit den *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>*-Zellen wurden ein Teil der Zellen zur morphologischen Untersuchung auf Objektträger zentrifugiert (Cytospins) und ein weiterer Teil der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die myeloid exprimierte Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung der Cytospins ergab, dass die

M/E-Zelllinien morphologisch einen frühen myeloblastischen Phänotyp aufwiesen (Abb. 8). Die FACS-Analyse zeigte, dass beide Zelltypen genotypunabhängig die Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b exprimierten, mit einer nicht signifikanten, aber reproduzierbar leicht geringeren Gr-1 Expression auf den M/E-*Mef2c*<sup>+/-</sup> Zellen (Abb. 8).

Zusammenfassend ließ sich durch diese Versuche zeigen, dass *Mef2c* nicht wichtig für die Etablierung und/oder Erhaltung des durch MLL/ENL induzierten LSZ-Phänotyps ist und somit im Kontext der leukämischen Transformation von Knochenmarkszellen durch MLL/ENL kein direktes Zielgen dieses Fusionsproteins ist.



**Abbildung 8: Charakterisierung der M/E-Zelllinien durch FACS und Cytospin.** Links, Cytospin zeigt myeloblastischen Phänotyp der M/E-Zelllinien, unabhängig vom Genotyp (Pappenheim-Färbung; Vergrößerung 40x). Rechts, FACS-Analyse der M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> und -*Mef2c*<sup>+/-</sup> Zellen: Beide Zelllinien exprimieren die myeloiden Oberflächenproteine Gr-1 und CD11b, leicht verminderte Gr-1 Expression auf M/E-*Mef2c*<sup>+/-</sup> Zellen.

## 5.2 Charakterisierung des Phänotyps der M/E-transformierten Zellen mit und ohne *Mef2c* *in vitro*

Leukämische Stammzellen stimmen in einigen Charakteristika mit gesunden, hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) überein. So besitzen beispielsweise beide Zelltypen die Fähigkeit der Selbsterneuerung oder können aufgrund äußerer Stimuli proliferieren und differenzieren, was im Falle der leukämischen Stammzellen zur weiteren Akkumulation reifungsgestörter Blutzellen führt. Eine weitere wichtige Eigenschaft früher hämatopoetischer Zellen ist ihre Migrationsfähigkeit. Auch leukämische Zellen können diese Kapazität wieder „zurückhalten“. Dies kann zum Beispiel dazu führen, dass leukämische Zellen auch in nicht-hämatopoetische Organe einwandern und dort „ansiedeln“. MLL-assoziierte Leukämien und LSZ weisen häufig einen solch invasiven Phänotyp auf.

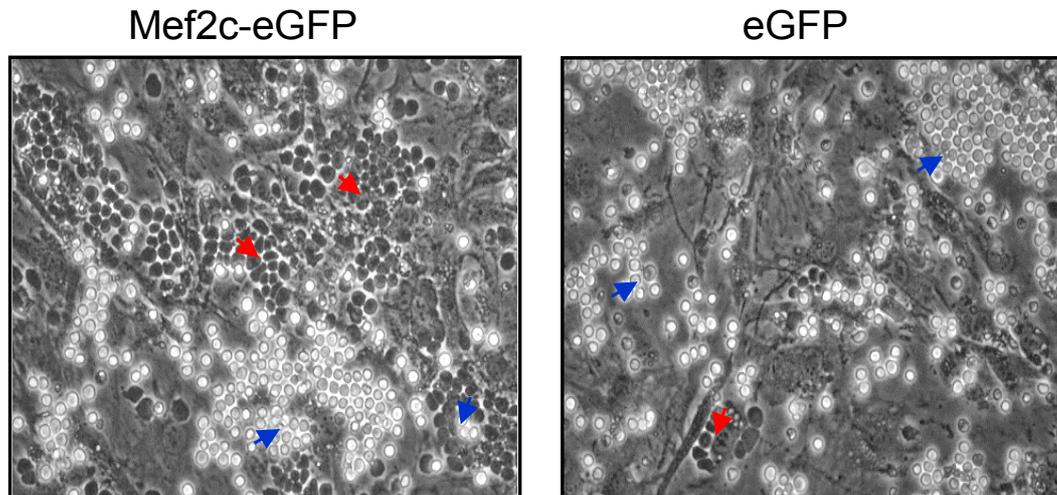
### 5.2.1. M/E-Mef2c-überexprimierende Zellen zeigen eine erhöhte Migrationskapazität auf MS-5 Stromazellen

In einem ersten Experiment zur weiteren Charakterisierung der M/E-transformierten Knochenmarkzelllinien sollte zunächst die Migrationskapazität dieser Zellen untersucht werden. Dazu wurde ein sogenannter Cobblestone-Assay durchgeführt, mit Hilfe dessen die Kapazität früher hämatopoetischer Zellen an MS-5 Stromazellen zu binden und diese zu unterwandern getestet wird. Die Interaktion zwischen der stromalen Zelllinie MS-5 und den auf diesen Zellen ausplattierten hämatopoetischen Zellen erfolgt aufgrund eines Zytokinmixes, der von den MS-5 Zellen sezerniert wird. Wenn entsprechende Oberflächenantigene auf den zu testenden Zellen exprimiert werden, können diese durch die sezernierten Zytokine stimuliert werden. Als Folge binden und unterwandern diese die MS-5 Zellen und bilden sogenannte Cobblestone-Einheiten unterhalb der MS-5 Einzelzellschicht.

Um zunächst zu testen, ob ein unterschiedlicher Expressionslevel von Mef2c einen Einfluss auf die Migrationskapazität der M/E-Zelllinien hat, wurde Mef2c ektopisch in M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen überexprimiert. Dazu wurden diese Zellen mit Mef2c/eGFP codierenden Gammaretroviren infiziert. Als Kontrolle dienten M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Zellen, die lediglich mit dem eGFP-Kontrollvektor infiziert wurden.

Im Anschluss an die Infektion wurden  $1 \times 10^6$  der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>/Mef2c/eGFP beziehungsweise M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>/eGFP Zellen auf murine MS-5 Stromazellen ausplattiert. Bereits nach 24 Stunden konnten mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops in den Kulturschalen mit Mef2c-überexprimierenden Zellen „dunkle“ Zellanhäufungen (Cobblestone-Einheiten) unterhalb der MS-5 Zellen nachgewiesen werden, die aus etwa 50% der ausplattierten M/E-Zellen gebildet wurden (Abb. 9, rote Pfeile). Die übrigen M/E-Zellen konnten als „helle“ Zellanhäufungen oberhalb der MS-5 Zellen detektiert werden (Abb. 9, blaue Pfeile). Auch in den Kulturschalen mit den M/E-eGFP Kontrollzelllinien wurden Cobblestone-Einheiten nachgewiesen, diese entstanden allerdings aus maximal 10% der ausplattierten M/E-Zellen (Abb. 9).

Die Mef2c-überexprimierenden M/E-Zellen zeigten somit eine erhöhte beziehungsweise beschleunigte Kapazität an MS-5 Stromazellen zu binden und sie zu unterwandern.



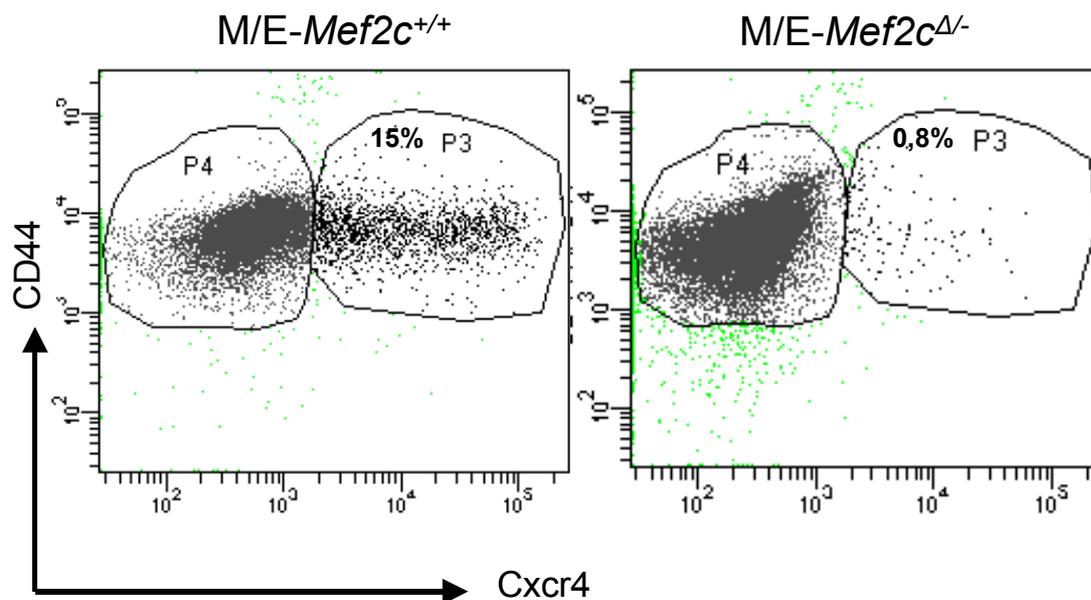
**Abbildung 9: Cobblestone Assay.** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>*-Zellen, manipuliert zur Überexpression von Mef2c-eGFP beziehungsweise eGFP. 24 Stunden nach Ausplattieren von je  $1 \times 10^6$  dieser Zellen auf MS-5-Stromazellen konnte zwischen hellen Zellanhäufungen, die oberhalb der MS-5 Zellen liegen (blaue Pfeile), und dunklen Zellanhäufungen unterhalb der MS-5 Zellschicht (rote Pfeile) unterschieden werden. (Vergrößerung 16x). Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

### 5.2.2 Mef2c führt zu einer vergrößerten Subpopulation mit Oberflächenexpression des Homing- und Migrations-assoziierten Rezeptors Cxcr4

Aufgrund der Beobachtung, dass Mef2c-überexprimierende M/E-Zellen eine erhöhte/beschleunigte Kapazität aufweisen, Cobblestone-Einheiten zu bilden, wurde im Folgenden untersucht, ob die Expression von Oberflächenrezeptoren, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Migration früher hämatopoetischer Zellen spielen, verändert ist. Hierzu gehören vor allem die Rezeptoren Cxcr4 und CD44. Da schon sehr geringe Unterschiede in der Oberflächenexpression dieser Rezeptoren die Migrationskapazität von Zellen beeinflussen können, wurden für die folgenden Untersuchungen *M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>* und *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* Zellen eingesetzt. So sollten Schwankungen im Mef2c-Expressionslevel durch Überexpression des Proteins als mögliche Störquelle ausgeschlossen werden.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnte durch die FACS-analytische Untersuchung kein Expressionsunterschied für den Rezeptor CD44 nachgewiesen werden, dieser wird unabhängig vom Genotyp der M/E-transformierten Zellen stark auf deren Oberfläche exprimiert (Abb. 10). Interessanterweise wurde jedoch in zahlreichen FACS-Analysen eine kleine, aber konstante Cxcr4-positive Zellpopulation (0,2% bis 15%) innerhalb der *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>*-Zellen beobachtet, die in Mef2c-defizienten Zellen nicht nachweisbar war. Gezeigt ist ein FACS-analytisches Beispiel in dem 15% der *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* Gesamtpopulation Cxcr4 auf der Oberfläche exprimieren, verglichen zu lediglich 0,8% der *M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>* Gesamtpopulation (Abb. 10).

Während also die Oberflächenexpression des Rezeptors CD44 genotypunabhängig stark war, lieferte diese Untersuchung einen ersten Hinweis darauf, dass die erhöhte Kapazität der Mef2c-überexprimierenden M/E Zellen Cobblestone-Einheiten zu bilden mit der verstärkten Detektion einer Cxcr4-positiven Subpopulation innerhalb der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen im Zusammenhang steht. Der durch die MS-5 Stromazellen sezernierte Zytokinmix enthält unter anderem den Cxcr4-Liganden SDF1 $\alpha$ .



**Abbildung 10: Expression der Oberflächenrezeptoren CD44 und Cxcr4 auf M/E-Mef2c<sup>+/+</sup> und -Mef2c<sup>Δ/-</sup>-Zellen.** Gezeigt ist ein FACS-analytisches Beispiel mit gleichmäßig starker, genotypunabhängiger Expression von CD44 auf M/E-Zellen und etwa 18fach vergrößerter Cxcr4 positiver Subpopulation innerhalb des M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Zellpools. Die FACS-Analyse wurde vielfach in unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Cxcr4-positive Subpopulation war innerhalb des M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Zellpools konstant zwischen 2- bis 18-fach vergrößert.

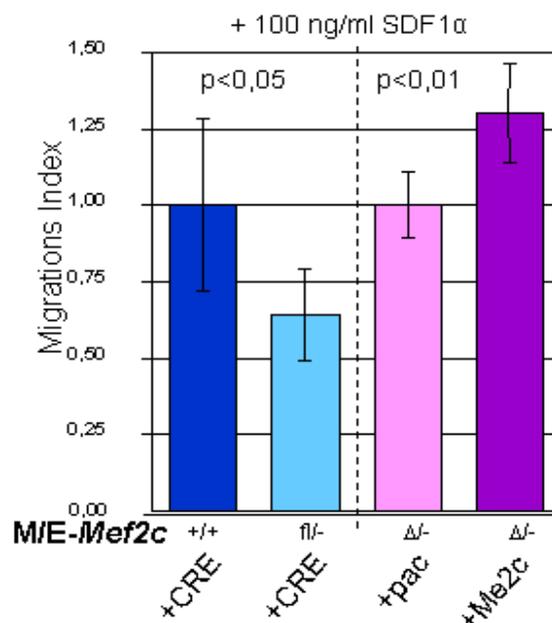
### 5.2.3 Quantifizierung der Migrationskapazität von Mef2c-exprimierenden und -defizienten M/E-Zellen

Um Unterschiede in der Migrationsfähigkeit quantifizieren zu können, wurden Versuche in Transmigrations-Kammern durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob die auf MS-5 Zellen beobachtete, verstärkte Migration der Mef2c-überexprimierenden M/E-Zellen in Abhängigkeit eines SDF1 $\alpha$ -Gradienten erfolgt und somit auf die vergrößerte Cxcr4-exprimierende Population zurückzuführen ist. Auch für die folgenden Versuche wurden M/E-Zellen mit Mef2c-Wildtyp beziehungsweise -defizientem Genotyp eingesetzt.

Zunächst wurden in einem jeweils dreifachen Ansatz  $1 \times 10^5$  M/E-Mef2c<sup>fl/-</sup>-CRE/eGFP beziehungsweise M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-CRE/eGFP Zellen in die obere Kammer einer 24-Loch-Transmigrations-Zellkulturplatte ausplattiert. Nach drei, fünf und 15 Stunden wurde in jedem Ansatz die Anzahl der Zellen bestimmt, die durch die 5  $\mu$ m-Porenmembran in die

untere Kammer, die Expansionsmedium supplementiert mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  enthielt, migriert waren. In zwei unabhängigen Experimenten konnte eine durchschnittlich um das 1,6-fach erhöhte Anzahl der M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-CRE/eGFP-Zellen verglichen mit den M/E-Mef2c<sup>fl/-</sup>-CRE/eGFP-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11). Um zu zeigen, dass die erhöhte Migrationsfähigkeit eine Folge der Mef2c-Expression ist, erfolgte eine zweite Versuchsreihe mit M/E-Mef2c <sup>$\Delta$ /-</sup> Zellen, in denen die Mef2c-Expression durch Infektion mit Mef2c/pac-codierenden gammaretroviralen Pseudotypen wiederhergestellt wurde. Als Kontrolle diente die gleiche Zelllinie, infiziert mit nur zur Pac-Expression manipulierten Gammaretroviren. Auch mit diesen Zelllinien konnte eine durchschnittlich um das 1,3-fach erhöhte Anzahl an Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen im Vergleich zu den Mef2c-defizienten M/E-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11). Es wurden ebenfalls drei Ansätze in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

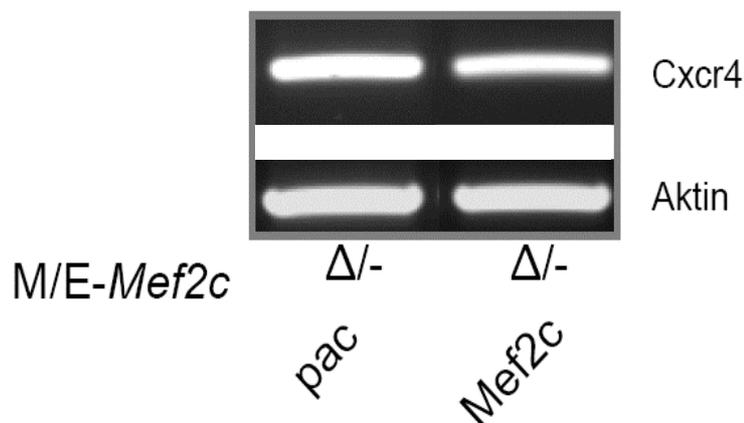
Zusammenfassend ließ sich durch diese Experimente zeigen, dass Mef2c-exprimierende M/E-Zellen eine zwar recht geringe, aber reproduzierbare erhöhte Migrationskapazität im Vergleich zu Mef2c-defizienten M/E-Zellen aufweisen. Die Migration erfolgt in Abhängigkeit eines SDF1 $\alpha$  Gradienten, was auf eine Rolle der Cxcr4-Oberflächenexpression hindeutet.



**Abbildung 11: Migrationskapazität der M/E-Zellen in Abhängigkeit von SDF1 $\alpha$  *in vitro*.** Gezeigt ist die Quantifizierung der Migration von jeweils  $1 \times 10^5$  ausplattierten M/E-Mef2c-exprimierenden beziehungsweise -defizienten Zellen nach drei, fünf und 15 Stunden in Richtung eines SDF1 $\alpha$  Gradienten. Sowohl M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>, als auch M/E-Mef2c <sup>$\Delta$ /-</sup>-Zellen, in denen die Expression von Mef2c durch Infektion mit entsprechend manipulierten gammaretroviralen Pseudotypen wiederhergestellt wurde, wiesen eine erhöhte Migrationskapazität auf. Das Experiment wurde jeweils im Triplet in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die p-Werte wurden durch den t-Test ermittelt.

#### 5.2.4. Expression des Cxcr4-Transkriptes in Mef2c-exprimierenden und -defizienten M/E-Zellen

Sowohl die immunohistochemischen FACS-Analysen als auch die *in vitro* Experimente zum Migrationsverhalten der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen verglichen mit den Mef2c-defizienten M/E-Zellen deuten darauf hin, dass der Chemokinrezeptor Cxcr4 eine Rolle in der leicht erhöhten Migrationsfähigkeit der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen spielt. Allerdings wird vor allem in der FACS-Analyse deutlich, dass die Größe der Cxcr4-exprimierenden Population innerhalb der M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Zellen variiert. Um zu untersuchen, ob die Mef2c-Expression die Cxcr4-Transkriptmenge beeinflusst, erfolgte eine RT-PCR-Reaktion. Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte auf mRNA-Ebene keine erhöhte Expression von Cxcr4 in M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen verglichen zu M/E-Mef2c-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Durch den Vergleich der Cxcr4-Banden mit den jeweiligen Aktin-Banden (Abb. 12) wird allerdings deutlich, dass die Cxcr4-mRNA in beiden Zelllinien recht stark exprimiert wird; die Zykluszahl war in beiden RT-PCR-Ansätzen gleich.



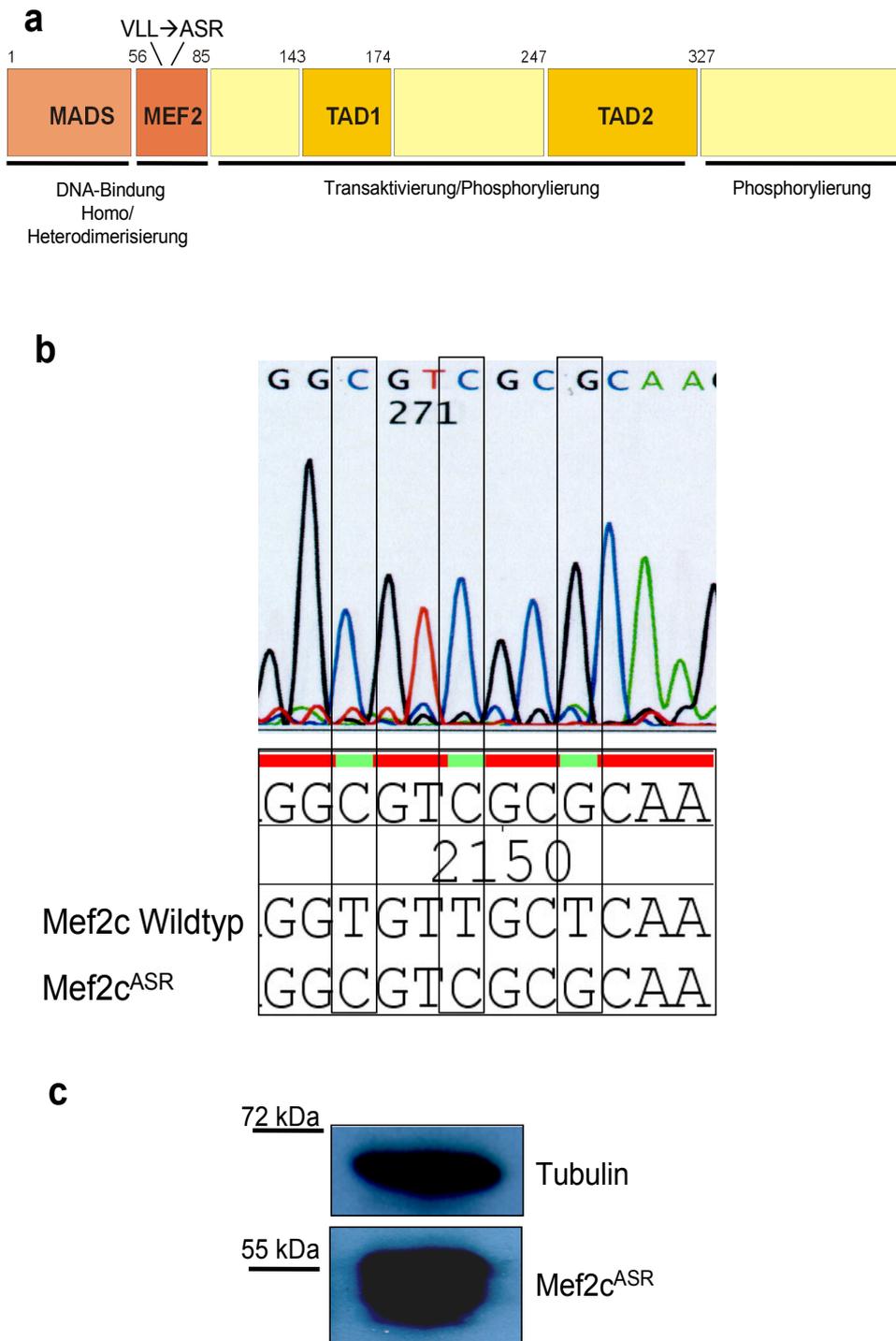
**Abbildung 12: RT-PCR Analyse des Expressionslevels der Cxcr4-mRNA in M/E-Mef2c-exprimierenden und -defizienten Zellen.** Die aus den angegebenen Zelllinien isolierte mRNA wurde revers in cDNA transkribiert und durch PCR mit entsprechenden Primer, die spezifisch an murin exprimiertes Cxcr4 binden, amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Der Vergleich mit der Expressionsstärke des Haushaltsgens *Aktin* zeigte keinen Unterschied in der Expressionsstärke von *Cxcr4* in M/E-Mef2c-exprimierenden beziehungsweise -defizienten Zellen.

### 5.3 Herstellung einer konstitutiv aktiven Form von Mef2c

Eine mögliche Verbindung zwischen der Mef2c Aktivität und der Cxcr4 Expression könnte die Calcium-Konzentration innerhalb der Zelle darstellen. Durch Erhöhung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Konzentration kann sowohl die Transkriptionsaktivität von Mef2c gesteigert werden (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000), als auch die Expression von Cxcr4 erhöht werden (<sup>85</sup>Moriuchi *et al.*, 1997). Um zu testen, ob eine Calcium-unabhängige und damit Stimulus-unabhängige Mef2c-Mutante die Cxcr4-Expression beeinflussen kann, wurde mit

Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese eine Form von Mef2c hergestellt, die nicht mehr in der Lage ist mit der Histondeacetylase 4 (HDAC4) zu interagieren (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000). Diese natürlicherweise in der Zelle vorkommende Interaktion vermindert die Aktivierung der Transkription durch Mef2c und wird über die Calcium-Konzentration innerhalb der Zelle reguliert.

Um diese mutierte Form von Mef2c herzustellen wurden in einer PCR Primer angewendet, die auf DNA-Ebene Basenaustausche in den Mef2c-wildtyp-Vektor (codiert für die  $\alpha$ 1-Isoform von Mef2c) einführen, so dass ein Mef2c Protein translatiert wird, das die Aminosäuren Alanin (65), Serin (66) und Asparagin (67) anstelle von Valin (65), Leucin (66), Leucin (66) trägt. Die veränderten Aminosäuren befinden sich innerhalb der spezifischen N-terminal gelegenen Mef2-Domäne (Abb. 13 a), so dass die hergestellte Mef2c-Mutante (Mef2c<sup>ASR</sup>) ohne Einschränkung an die DNA binden, aber keine Interaktion mit HDAC4 mehr stattfinden kann. Der Austausch der entsprechenden Basen konnte durch Sequenzierung verifiziert werden (Abb. 13 b). Die Expression des Proteins konnte in transplantierten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 13 c). Die dafür verwendeten Knochenmarkzellen waren mit gammaretroviralen Pseudotypen infiziert, die für die entsprechende Mutante codierten.



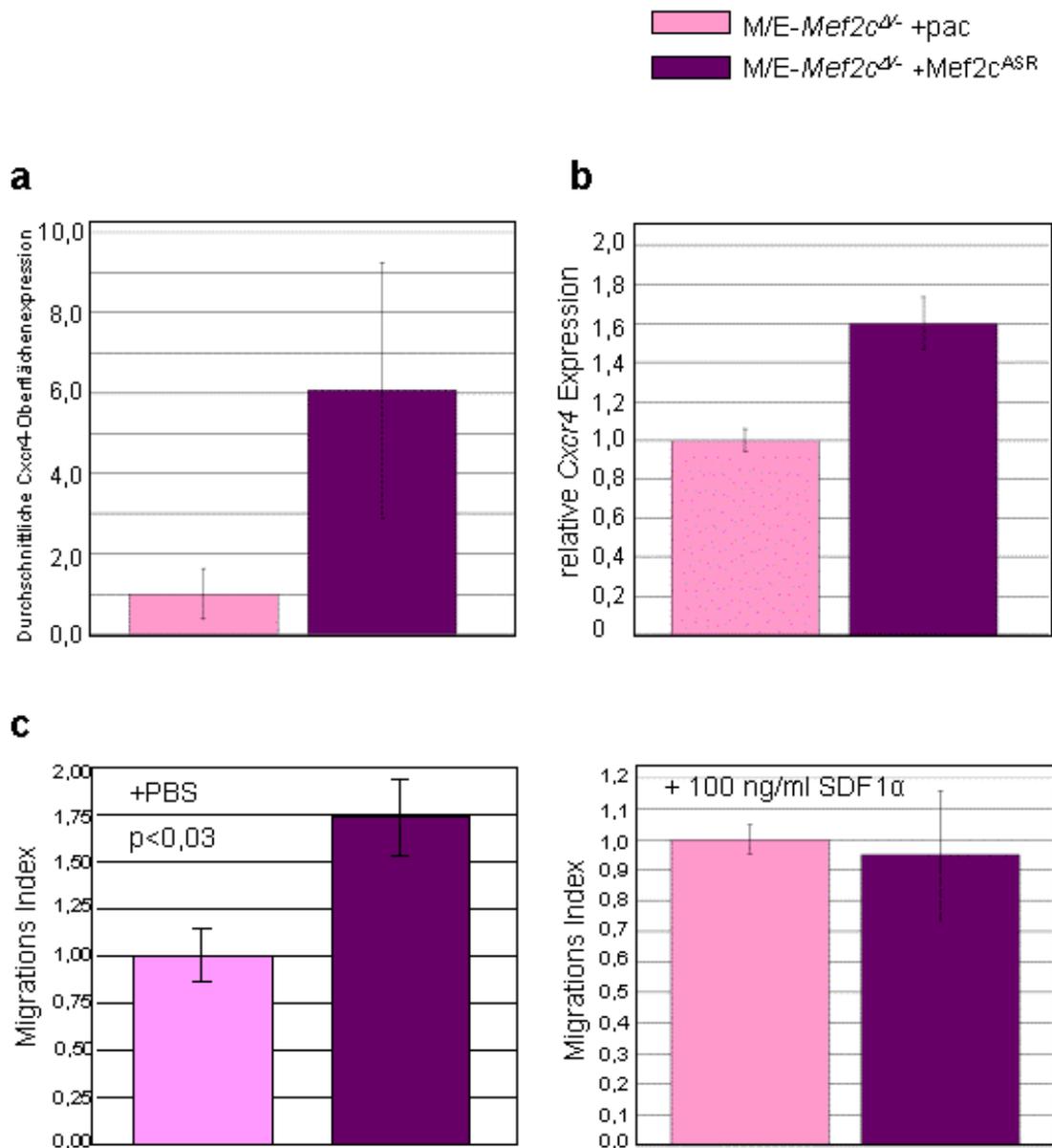
**Abbildung 13: Herstellung einer konstitutiv aktiven Form von Mef2c.** (a) schematische Darstellung des im Bereich der Mef2-Domäne mutierten Mef2c Proteins, das an den Positionen 65, 66 und 67 die Aminosäuren Alanin, Serin und Asparagin anstelle von Valin, Leucin und Leuin exprimierte. In dieser Form von Mef2c ist die DNA-Bindung und Homodimerisierung erhalten, aber es erfolgt keine Heterodimerisierung mehr mit Klasse IIa-HDACs. (b) Verifizierung der auf DNA-Ebene stattgefundenen Mutation. Die durch orstspezifische Mutagenese ersetzten Basen sind hervorgehoben und konnten durch Sequenzierung bestätigt werden. (c) Nachweis der Expression des mutierten Proteins. Zur Überprüfung wurden B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen mit Gammaretroviren infiziert, die zur Expression der Mef2c<sup>ASR</sup>-Form manipuliert waren. Der eingesetzte Antikörper kann nicht zwischen der Wildtyp- und mutierten Form von Mef2c unterscheiden, aber in voran gegangenen Experimenten konnte keine Expression von endogenem Mef2c in B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen nachgewiesen werden.

### 5.3.1 Mef2c<sup>ASR</sup> führt zu einer vergrößerten Cxcr4-exprimierenden Subpopulation und verstärkter Migration der M/E-Zellen

Im Folgenden wurden nun M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Zellen mit gammaretroviralen, Mef2c<sup>ASR</sup>/Pac-codierenden Pseudotypen infiziert. Als Kontrolle dienten *Mef2c*-defiziente M/E-Zellen, die mit zur Pac-Expression manipulierten Retroviren infiziert wurden. Nach erfolgreicher Selektion der infizierten Zellen mit Hilfe von Puromycin erfolgte die Charakterisierung dieser „neuen“ Zelllinie.

Durch immunohistochemische FACS-Analyse konnte eine durchschnittlich um das 6-fach vergrößerte Population Cxcr4-exprimierender Zellen innerhalb der Mef2c<sup>ASR</sup>-transduzierten M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>-Zellen im Vergleich zu den *Mef2c*-defizienten M/E-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14 a). Durch *real-time* PCR wurde allerdings eine nur geringe, um das 1,6-fach gesteigerte Expression der Cxcr4-mRNA identifiziert (Abb. 14 b). Zur Quantifizierung der Migrationsfähigkeit dieser Zellen wurden die Experimente mit 24-Loch-Transmigrations-Zellkulturplatten wie unter Punkt 5.2.3 beschrieben, wiederholt. Die Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen zeigten eine um das durchschnittlich 1,75-fach gesteigerte Migrationskapazität verglichen mit den *Mef2c*-defizienten M/E-Zellen. Dies konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn dem Expansionsmedium in der unteren Kammer kein SDF1α zugesetzt war (Abb. 14 b). Die Supplementierung des Expansionsmediums mit dem Cxcr4-Liganden SDF1α ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14 c).

In der Summe zeigten die mit Mef2c<sup>ASR</sup> transduzierten M/E-Zellen eine vergrößerte Population Cxcr4-exprimierender Zellen im Vergleich zu *Mef2c*-defizienten und *Mef2c*-wildtyp exprimierenden M/E-Zellen. Die Migrationsfähigkeit der Mef2c<sup>ASR</sup>-M/E-Zellen war in Abwesenheit des Cxcr4-Liganden SDF1α deutlich erhöht, ein Effekt der in Anwesenheit des Liganden verloren ging.



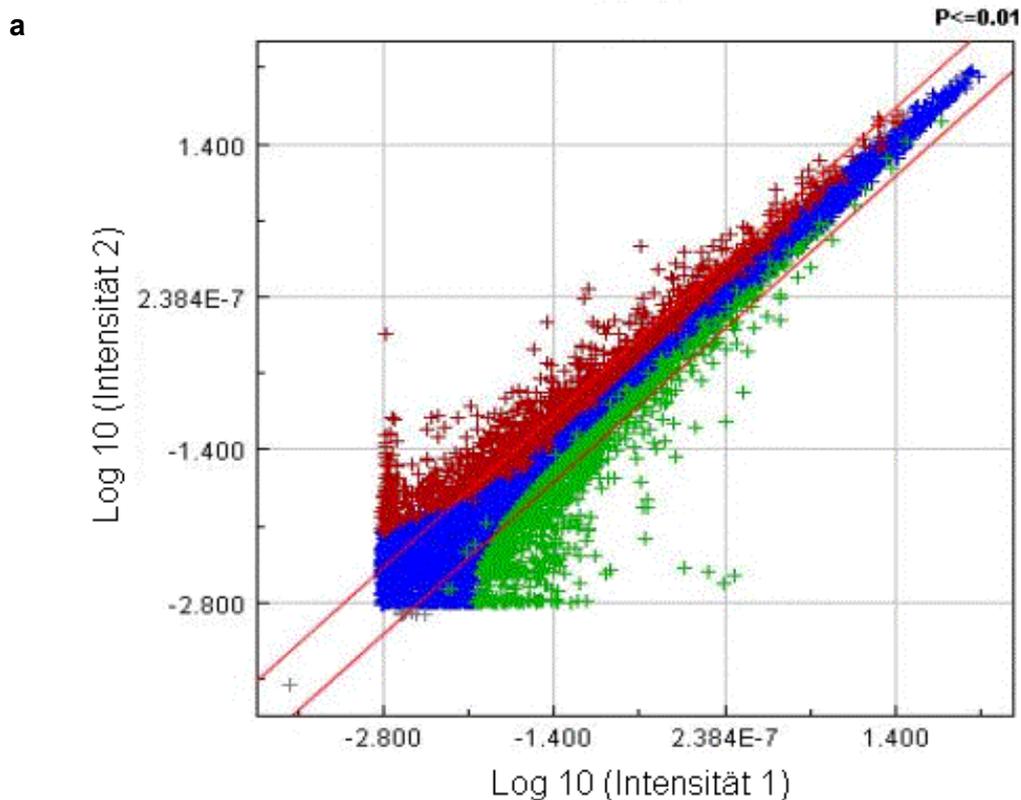
**Abbildung 14: Charakterisierung der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen.** (a) Quantifizierung von drei unabhängigen FACS-analytischen Experimenten zur Cxcr4-Oberflächenexpression. Innerhalb der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen war die Cxcr4-positive Subpopulation durchschnittlich um das 6fache vergrößert im Vergleich zu M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Zellen. (b) Untersuchung der Cxcr4-mRNA Expression in M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen verglichen zu M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Zellen durch quantitative *real-time* PCR. In zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Dupletts der Proben konnte eine 1,6-fach erhöhte Konzentration der Cxcr4-cDNA aus M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup> Zellen nachgewiesen werden. (c) Quantifizierung der Migrationskapazität von jeweils 1 x 10<sup>5</sup> ausplattierten M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen verglichen mit M/E-Mef2c-defizienten Zellen. M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen zeigten durchschnittlich eine um das 1,75-fach erhöhte Migrationskapazität, die ungerichtet in die untere Kammer der Transmigrations-Zellkultur-Platte erfolgte (links), p-Wert ermittelt im t-Test. Nach Supplementierung der unteren Kammer mit 100 ng/ml SDF1α konnte die erhöhte Migrationsfähigkeit der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden (rechts). Die *in vitro* Migrationsexperimente wurden als Triplett in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

#### 5.4 Das gesamtgenomische Expressionsprofil M/E-transformierter Zellen

Die bisher gezeigten Experimente deuten darauf hin, dass die erhöhte Migrationskapazität der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen verglichen mit den Mef2c-defizienten M/E-Zellen eine Folge der vergrößerten Cxcr4-exprimierenden Subpopulation innerhalb der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen ist. Allerdings konnte *Cxcr4* nicht als direktes Zielgen von Mef2c identifiziert werden; sowohl in einer RT-PCR (Abb. 12) als auch durch Anwendung der quantitativen *real-time* PCR (Abb. 14) konnte kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke des *Cxcr4*-Transkripts in Mef2c-exprimierenden verglichen mit -defizienten M/E-transformierten Zelllinien nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die *Cxcr4*-Oberflächenexpression eventuell durch andere, Mef2c-abhängige Mechanismen reguliert wird.

##### 5.4.1 Die Transduktion der M/E-Zellen mit Mef2c<sup>ASR</sup> führt zur Hochregulation von verschiedenen Chemokinrezeptoren- und -liganden-, sowie Matrix-Metalloprotease (Mmp)-Genen

Um mögliche direkte Zielgene von Mef2c identifizieren zu können wurde eine gesamtgenomische Microarray-Analyse der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac Zellen vorgenommen. Die Expressionsstärke der untersuchten Gene wurde mit der Expressionsstärke der identischen Gene aus M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-pac Zellen verrechnet, wodurch die in M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac Zellen signifikant herauf- oder herabregulierten Gene identifiziert werden konnten. In Abbildung 15 a ist dies in einer Übersicht dargestellt; der Logarithmus des Quotienten, der sich aus der Verrechnung der Expressionsstärke jedes untersuchten Genes der beiden M/E-Zelllinien ergibt, ist in einem entsprechend logarithmischen Koordinatensystem jeweils als Punkt dargestellt. Die roten Punkte stehen hier für in M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac Zellen hochregulierte Gene, während die grünen Punkte die in diesen Zellen herunterregulierten Gene symbolisieren.



**Abbildung 15: Gesamtgenomische Expressionsanalyse der M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>- und M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>-Zellen.** (a) Übersicht der gesamtgenomischen Expressionslevel der durch Microarray-Technik untersuchten Gene. Auf Basis der Expressionsstärke in M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup> Zellen konnten die in M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen hoch- und herunterregulierten Gene identifiziert werden. Die ermittelten Quotienten aus der Gen-Expressionsstärke in M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup> und M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup> sind im Diagramm schematisch als rote und grüne Punkte dargestellt. Jeder rote Punkt steht für ein in M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup> hochreguliertes Gen, jeder grüne Punkt für ein herunterreguliertes Gen. Zur vereinfachten Darstellung ist der Logarithmus zur Basis 10 gewählt.

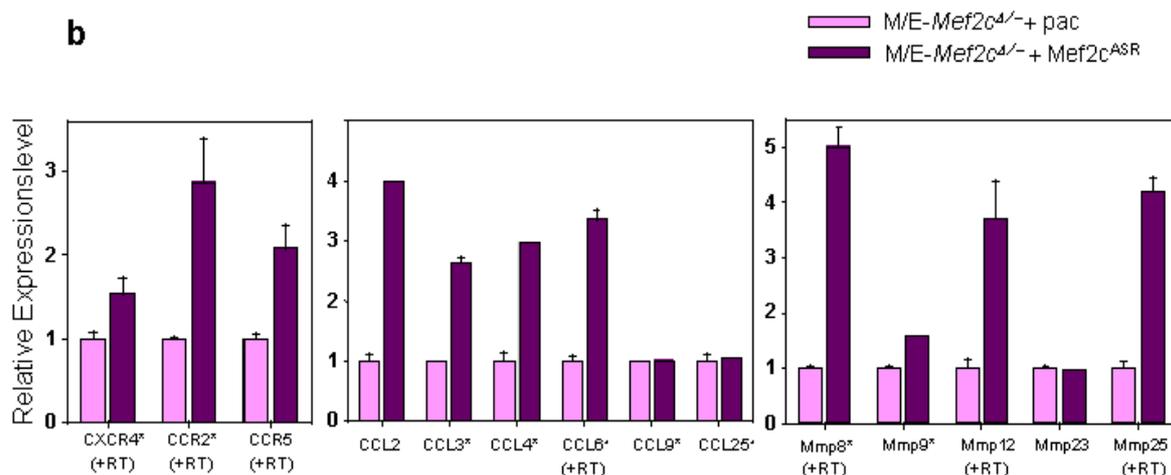
Die genauere Untersuchung der Expressionslevel Migrations-assoziiierter Gene ist in Abbildung 15 b dargestellt. Für die Chemokinrezeptor-Gene *Ccr2* und *Ccr5* konnte eine signifikante, etwa 3-fache beziehungsweise 2-fache Hochregulation nachgewiesen werden. *Ccr2* wird zudem sehr stark in beiden Zelllinien exprimiert (> 50-fach höhere Signalintensität verglichen mit Hintergrundsignal). Auch die starke Expression von *Cxcr4* (ebenfalls > 50-fach höhere Signalintensität verglichen mit Hintergrundsignal) in beiden Zelllinien und die nur sehr geringe Hochregulation dieses Gens in M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac wurde durch die Microarray-Analyse bestätigt. Neben diesen Chemokinrezeptor-Genen konnte ebenfalls eine signifikante Hochregulation einiger Chemokinliganden-Gene identifiziert werden. Die stärkste Expression (> 100-fach höhere Signalintensität verglichen mit Hintergrundsignal) und Hochregulation (bis 3-fach) wurde für die auf Chromosom 11 gruppierten Chemokin-Gene *Ccl3*, *Ccl4* und *Ccl6* nachgewiesen (Abb. 15 b). Auch das Gen des Liganden des Chemokinrezeptors *Ccr2*, *Ccl2* zeigte eine signifikante 4-fache Hochregulation, allerdings eine geringere absolute Expressionsstärke verglichen mit den bereits beschriebenen

Chemokin-Genen (Abb. 15 b). Für das Gen des Cxcr4-Liganden *Cxcl12* (codiert für SDF1 $\alpha$ ) konnte weder eine Hochregulation in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac noch eine starke Expression in beiden M/E-Zelllinien nachgewiesen werden.

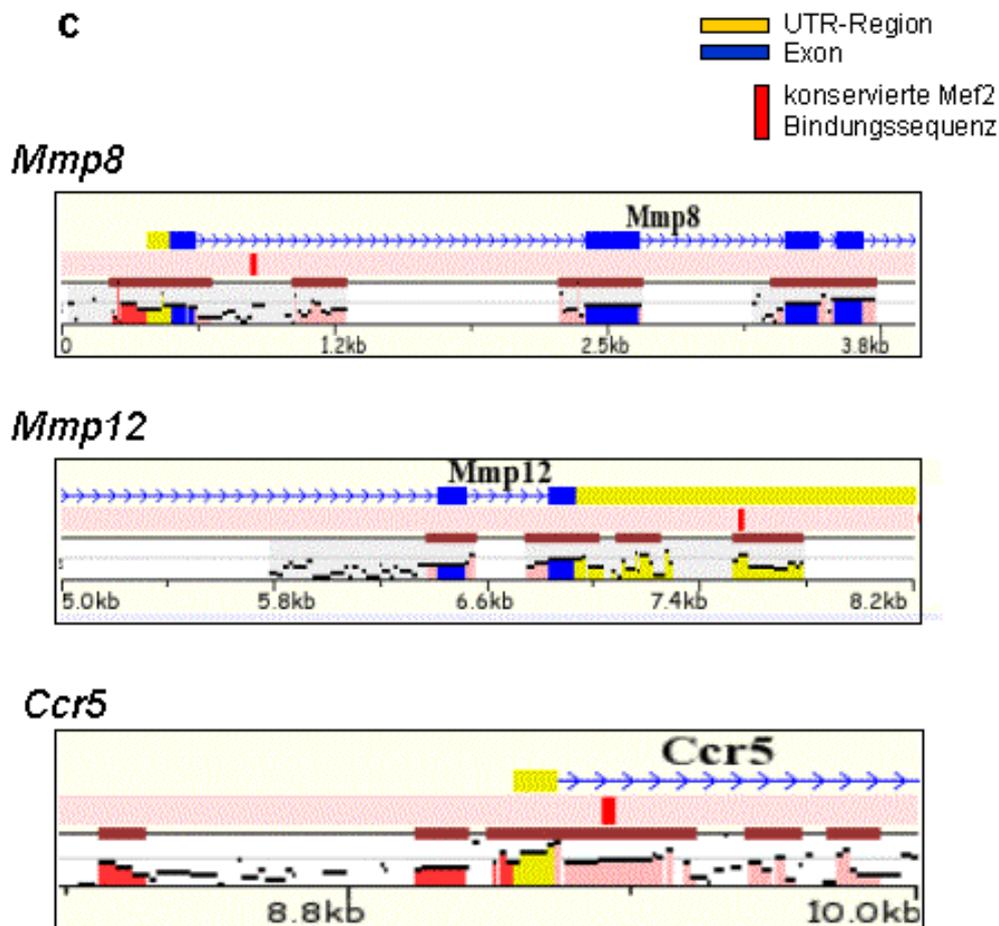
Neben den Chemokinrezeptor- und -liganden-Genen wurden einige Matrix-Metalloprotease-Gene als signifikant hochreguliert in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac gefunden. *Mmp8* zeigte eine 5-fach, *Mmp12* eine ca. 3,7-fach und *Mmp25* eine 4-fach stärkere Expression in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-pac Zellen verglichen zu M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/pac-Kontrollzellen. Für *Mmp8* und *Mmp9* wurde zudem eine recht hohe absolute Expressionsstärke (> 20-fach höhere Signalintensität verglichen mit Hintergrundsignal) nachgewiesen.

Mit Hilfe der Software rVista 2.0 (<http://rvista.dcode.org/>) konnten innerhalb der regulatorischen Sequenzen der Gene *Mmp8* und *Mmp12*, sowie *Ccr5* konservierte Bindungssequenzen für Mef2-Transkriptionsfaktoren gefunden werden (Abb. 15 c). Durch *real-time* PCR wurde die Hochregulation der Chemokinrezeptor-Gene *Ccr2* und *Ccr5*, sowie des Chemokinliganden-Gens *Ccl6* und der Matrix-Metalloprotease-Gene *Mmp8*, *Mmp12* und *Mmp25* verifiziert.

Zusammenfassend bestätigt die Microarray Analyse somit die Hypothese, dass die Mef2c-Expression in Zusammenhang mit der Hochregulation einiger Migrations-assoziiierter Faktoren steht.



**Abbildung 15: Gesamtgenomische Expressionsanalyse der M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>- und M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>-Zellen.** (b) Durch Microarray Analyse konnte eine Hochregulation der Chemokinrezeptor-Gene *Ccr2* und *Ccr5*, sowie der Chemokinliganden-Gene *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4* und *Ccl6* in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen detektiert werden. Weiterhin wurden die Matrix-Metalloprotease-Gene *Mmp8*, *Mmp12* und *Mmp25* in diesen Zellen als hochreguliert identifiziert. Die Expression der mit (+RT) gekennzeichneten Gene wurde durch quantitative *real-time* PCR bestätigt. Die mit \* gekennzeichneten Gene zeigten in der Microarray Analyse eine hohe absolute Expression mit mindestens 20fach stärkerer Signalintensität als das Hintergrundsignal auf.



**Abbildung 15: Gesamtgenomische Expressionsanalyse der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/Mef2c<sup>ASR</sup>- und M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Zellen.** (c) Schematische Darstellung konservierter Mef2-Bindungsgebiete innerhalb regulatorischer Sequenzen der Gene *Mmp8*, *Mmp12* und *Ccr5*. Diese Bereiche konnten durch Vergleich der DNA-Sequenz von Mensch und Maus mit Hilfe der Software rVista2.0 identifiziert werden.

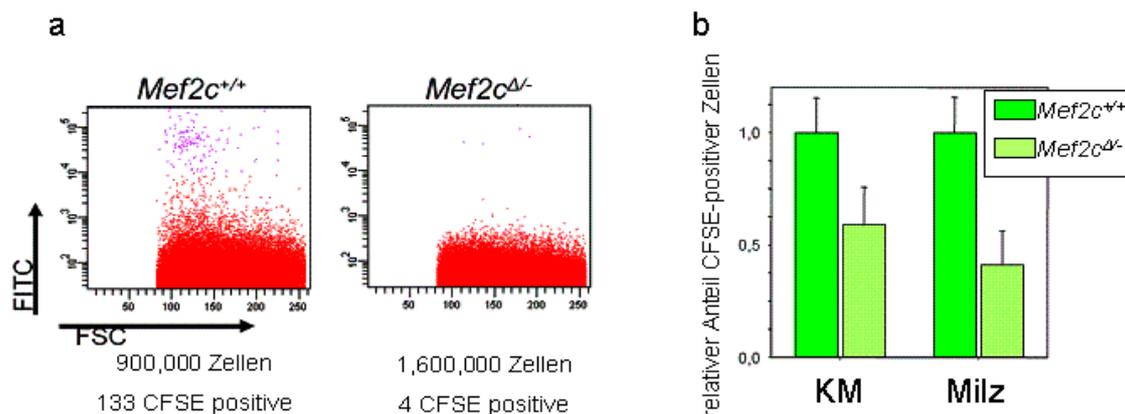
## 5.5 Mef2c führt zu einer erhöhten Homing Kapazität von Knochenmarkzellen

### *in vivo*

Die bisherigen Experimente zeigten, dass Mef2c in einer mit MLL/ENL transformierten Zelllinie Einfluss auf die Migrationsfähigkeit dieser Zellen (entlang eines SDF1 $\alpha$  Gradienten) hat. Um zu testen, ob die Expression von Mef2c *per se* die Migrationsfähigkeit von Knochenmarkzellen entlang eines SDF1 $\alpha$  Gradienten beeinflusst, wurde zunächst Knochenmark aus B6-Mef2c<sup>fl/fl</sup>/MxCre und B6-Mef2c<sup>+/+</sup>/MxCre Mäusen isoliert. Die frisch entnommenen und suspendierten Knochenmarkzellen wurden anschließend in Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) inkubiert. Nach Aufnahme dieser Substanz in das Zytoplasma der Zellen erfolgt der Abbau durch Proteasen was zur Bildung fluoreszierender Zwischenprodukte führt. Dadurch können CFSE-positive Zellen im FITC-Kanal des FACS-Gerätes detektiert werden. Jeweils 1 x 10<sup>7</sup> der so behandelten Zellen

wurden pro lethal bestrahlter Maus (9 Gy; 23,5 Minuten) *intra venös* durch die Schwanzvene injiziert. Die Bestrahlung sollte zur Sezernierung von SDF1 $\alpha$  durch zum Beispiel Osteoklasten und Milzzellen führen, wodurch ein SDF1 $\alpha$ -Gradient im bestrahlten Organismus aufgebaut wird, der zur Migration von Cxcr4-exprimierenden Zellen zu den entsprechenden Organen führt. Vier Stunden nach Injektion der CFSE-behandelten *Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>- beziehungsweise *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen wurden die Tiere abgetötet und Knochenmark sowie die Milzen entnommen. Nach Vereinzelung der Zellen erfolgte eine FACS-Analyse zur Detektion und Quantifizierung der CFSE-positiven *Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>- beziehungsweise *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen. In Abbildung 16 a ist beispielhaft die Analyse von Knochenmarkszellen aus je einer *Mef2c*<sup>+/+</sup>- und einer *Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängermaus dargestellt. Hier wird deutlich, dass die CFSE-positiven Zellen eindeutig detektiert werden können. Insgesamt ergab die Quantifizierung, dass im Knochenmark der *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere durchschnittlich eine 2-fach höhere Anzahl an CFSE-positiven Zellen gefunden wurde verglichen mit den *Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängertieren (Abb. 16 b). In den Milzen der *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere wurden sogar durchschnittlich 2,5-fach mehr CFSE-positive Zellen als in den Milzen der *Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängertiere gefunden (Abb. 16 b).

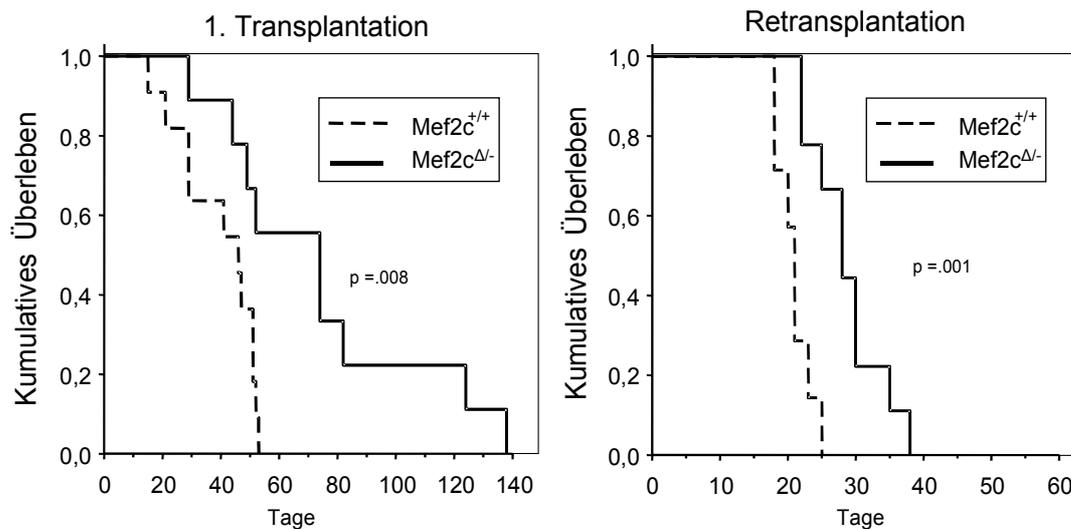
Diese Untersuchung ergab somit, dass auch *in vivo* *Mef2c*-exprimierende Knochenmarkszellen eine erhöhte Migrationsfähigkeit beziehungsweise verstärkte Homingkapazität, aufweisen. Dies konnte innerhalb eines kurzen Zeitraumes nach Transplantation der *Mef2c*-exprimierenden beziehungsweise -defizienten Knochenmarkszellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 16: Migrations- und Homingkapazität von C57Bl/6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und -*Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>-Knochenmarkszellen *in vivo*.** (a) FACS-analytisches Beispiel von Knochenmark, isoliert aus je einem B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>- beziehungsweise -*Mef2c*<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängertier, 4 Stunden nach Transplantation von  $1 \times 10^7$  Zellen, die mit CFSE inkubiert wurden. Im Knochenmark aus dem B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertier konnte eine CFSE-positiv Population eindeutig identifiziert werden. (b) Quantifizierung der CFSE-positiven Zellen aus Knochenmark und Milz aus zwei unabhängigen Experimenten. Die B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen zeigten eine beschleunigte Kapazität nach Transplantation in bestrahlte Empfängertiere in das Knochenmark und die Milz zu migrieren und dort anzusiedeln.

## 5.6 Mef2c führt zu einer erhöhten Invasivität MLL/ENL-transformierter Knochenmarkstammzellen

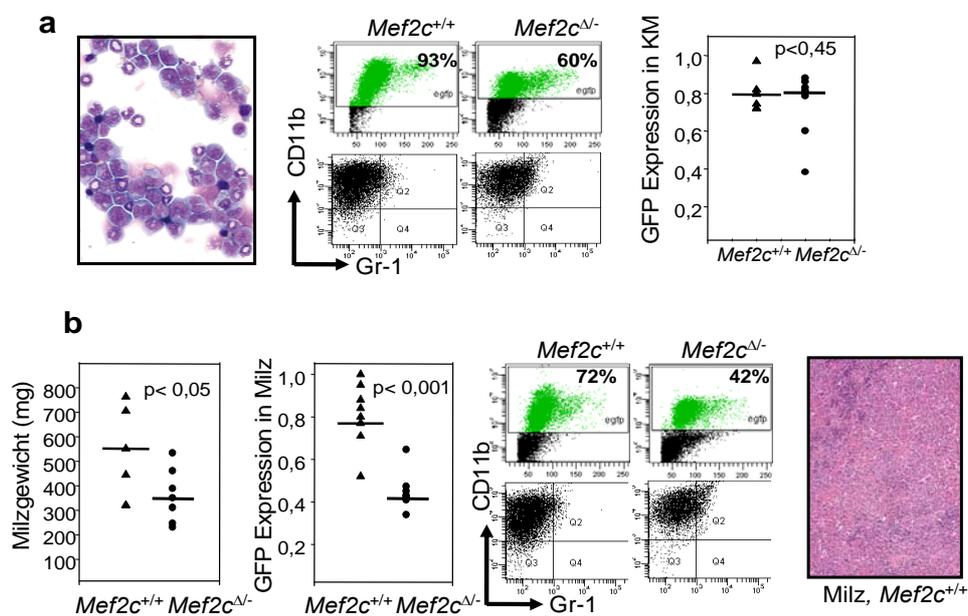
Da die Transformation von Knochenmarkszellen durch MLL-Fusionsproteine zur Induktion von leukämischen Stammzellen (LSZ) und zur Ausbildung einer aggressiven Leukämie mit schlechter Prognose führt, sollte untersucht werden, ob Mef2c bei der Ausbreitung von MLL/ENL transformierten LSZ im Mausmodell eine Rolle spielt. Dazu wurde Knochenmark aus B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>/MxCre und B6-*Mef2c*<sup>fl/-</sup>/MxCre isoliert und auf Linien-negative Vorläuferzellen sortiert. Im Anschluss erfolgte die Immortalisierung durch gammaretrovirale Pseudotypen, die für das Fusionsprotein MLL/ENL-eGFP codierten. In der ersten Versuchsreihe wurde mit 25% beziehungsweise 29% eine effiziente Transduktion der *Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise *Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Knochenmarkszellen mit dem MLL/ENL-eGFP Konstrukt erzielt. Es folgte die *intra venöse* Transplantation von jeweils  $1 \times 10^6$  MLL/ENL-eGFP/*Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise *Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Knochenmarkszellen in lethal bestrahlte Tiere. Beide Kohorten entwickelten nach kurzer Latenzzeit (mittlere Überlebenszeit der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere 52 Tage, mittlere Überlebenszeit der M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängertiere 75 Tage, Abb. 17) eine aggressive Leukämie. Diese war charakterisiert durch eine Ausbreitung von CD11b und eGFP (MLL/ENL) positiven Zellen im Knochenmark und der Milz. Die Retransplantation von  $5 \times 10^6$  der leukämischen Zellen in nicht bestrahlte Empfängermäuse führte erneut zur Ausbildung einer aggressiven Leukämie mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 20 (M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Empfängermäuse), beziehungsweise 30 Tagen (M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängertiere; Abb. 17).



**Abbildung 17: Transplantation von M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise -*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Zellen in lethal bestrahlte Mäuse.** Dargestellt ist das kumulative Überleben der beiden Empfängerkohorten gegen die Zeit (Tage). Das durchschnittliche Überleben der mit je  $1 \times 10^6$  M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Knochenmarkzellen transplantierten Mäuse lag bei 52 Tagen, während die mit M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>-Knochenmarkzellen transplantierten Tiere eine mittlere Überlebenszeit von 75 Tagen aufwiesen. Die statistische Signifikanz wurde durch Vergleich der Überlebenskurven im log-rank Test nachgewiesen ( $p < 0,008$ ) (b) Nach Retransplantation von je  $5 \times 10^6$  leukämischen Zellen aus dem 1. Transplantationsversuch lag das durchschnittliche Überleben der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere bei 20 Tagen, das der M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>-Empfängertiere bei 30 Tagen;  $p < 0,001$  im log-rank Test.

Um den Krankheitsverlauf der Empfängertiere besser untersuchen zu können wurde eine zweite Versuchsreihe vorgenommen. Wie oben beschrieben wurde zunächst Knochenmark aus B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup>/MxCre und B6-*Mef2c*<sup>fl/-</sup>/MxCre isoliert und auf Linien-negative Vorläuferzellen sortiert. Nach der Transduktion des frisch isolierten Knochenmarks mit MLL/ENL-eGFP codierenden gammaretroviralen Pseudotypen wurde zunächst die Infektionsrate durch eine FACS Analyse bestimmt. Es folgte eine Verdünnung der transduzierten Knochenmarkzellen mit nicht-transduzierten Knochenmarkzellen, so dass  $1 \times 10^6$  Zellen, die einheitlich zu 5% mit MLL/ENL transduziert waren, in lethal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert werden konnten. Die ersten Tiere zeigten ca. 50 Tage nach der Transplantation Krankheitszeichen (Hecheln, leichte Kachexie, hell werdende Pfoten). Um die Tiere vergleichend untersuchen zu können, wurden alle Mäuse des Versuchs innerhalb von drei Tagen abgetötet und inspiziert. Es wurde jeweils Knochenmark, Milz und Leber entnommen sowie auf angeschwollene Lymphknoten untersucht. Das Knochenmark zeigte in beiden Empfängerkohorten eine fast exklusive Zusammensetzung aus CD11b positiven Myeloblasten (Abb. 18 a). Weiterhin waren im Knochenmark beider Empfängerkohorten durchschnittlich 80% der Zellen eGFP (MLL/ENL) positiv (Abb. 18 a). Innerhalb des Zeitraumes zwischen der Transplantation und der Untersuchung der Tiere (circa 50 Tage) waren somit alle MLL/ENL-transformierten Zellen unabhängig vom *Mef2c*-

Genotyp in der Lage im Knochenmark anzusiedeln, so dass die Leukämie von diesem Organ aus ihren Ursprung nahm. Die weitere Untersuchung der Tiere zeigte in beiden Empfängerkohorten eine stark ausgeprägte Splenomegalie, allerdings unterschieden sich die Milzen zwischen den beiden Kohorten sowohl in der Größe, als auch im Prozentsatz eGFP (MLL/ENL) positiver Zellen. Während die *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* Empfängermäuse ein durchschnittliches Milzgewicht von 550 mg und durchschnittlich 79% eGFP positive Zellen aufwiesen, lag das durchschnittliche Gewicht der Milzen der *M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermäuse bei nur 350 mg mit durchschnittlich 42% eGFP positiven Zellen (Abb. 18 b). Histologisch konnte nachgewiesen werden, dass in beiden Empfängerkohorten die normale Milzstruktur, vor allem im Bereich des roten Marks durch myeloblastische Zellen zerstört war (Abb. 18 b).

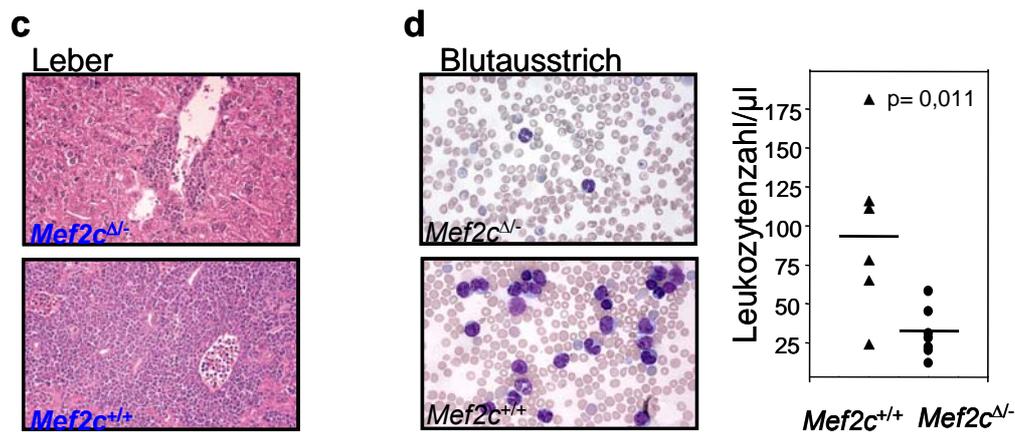


**Abbildung 18: Transplantation von je  $1 \times 10^6$  *Mef2c<sup>+/+</sup>* beziehungsweise *Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Linien-negativen Knochenmarkszellen, zu 5% mit MLL/ENL transduziert; (a) links, Cytospin von suspendierten Knochenmarkszellen einer *M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermaus zeigte eine Akkumulation von Myeloblasten und unreifen myeloiden Zellen, 50 Tage nach Transplantation; (Pappenheim-Färbung; Vergrößerung 40x); Mitte, FACS-analytisches Beispiel von Knochenmarkszellen aus einer *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* und *-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermaus. Unabhängig vom Genotyp exprimierten die eGFP-positiven (M/E-transformierten) Zellen vor allem den monozytären Oberflächenmarker CD11b. Rechts, hohe eGFP-Expression in allen *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* und *-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermäusen. Jeder Punkt steht für die %-eGFP Expression einer Maus. Im Mittel war das Knochenmark beider Empfängerkohorten 50-54 Tage nach Transplantation zu 80% eGFP positiv. (b) Links, Darstellung des Milzgewichtes aller *Mef2c<sup>+/+</sup>* und *-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermäuse im Punktediagramm. Jeder Punkt stellt das Milzgewicht einer Maus dar. Im Mittel war das Milzgewicht der *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* Empfängermäuse mit 550 mg signifikant höher als das der *M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermäuse mit 350 mg. Mitte links, Darstellung der %-eGFP-Expression suspendierter Milzzellen aller Mäuse des Experimentes im Punktediagramm. Im Mittel war die eGFP-Expression in *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* Empfängermäusen signifikant höher als in *M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermäusen. Mitte rechts, FACS-analytisches Beispiel von suspendierten Milzzellen aus einer *M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>* und *-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermaus. Unabhängig vom Genotyp exprimierten die eGFP-positiven Milzzellen (M/E-transformiert) vor allem den monozytären Oberflächenmarker CD11b. Rechts, Mikroskopische Darstellung eines Milzschnittes einer *M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>* Empfängermaus. Die gesamte Milzstruktur ist im Bereich des roten Marks durch eingewanderte myeloide M/E-Zellen zerstört (H&E Färbung, Vergrößerung 16x). ( $p$ -Werte durch t-Test ermittelt).**

Weitere Indizien für eine erhöhte Migrationskapazität der Mef2c-exprimierenden M/E-transformierten Knochenmarkzellen waren die Anschwellung peripherer Lymphknoten in fünf von sieben M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Empfängermäusen, aber in nur zwei von acht M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängermäusen. Die morphologische und immunohistochemische Untersuchung des Blutes ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Verteilung leukämischer Zellen zwischen den beiden Empfängerkohorten. Sowohl die Cytospins, als auch die FACS-Analyse des Blutes der M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Empfängermäuse zeigte eine unnormale, hohe Anzahl unreifer Myeloblasten und weiterer reifungsgestörter Zellen im peripheren Blut. Zudem war die Anzahl der Leukozyten in M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Empfängermäusen nicht nur krankhaft, sondern ebenfalls signifikant höher als in M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängermäusen (Abb. 18 d).

Neben den hämatopoetischen Organen Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Blut waren auch nicht-hämatopoetische Organe von der Ausbreitung der leukämischen Zellen betroffen. Sieben von acht M/E-Mef2c<sup>+/+</sup> Empfängermäusen wiesen eine starke Hepatomegalie auf, wovon allerdings nur zwei von acht M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup> Empfängermäuse betroffen waren. Die morphologische Untersuchung bestätigte, dass die lobuläre Leberstruktur in allen Tieren mit Hepatomegalie bereits zerstört war. Vor allem das Parenchym im Bereich der Pfortader und der Lebervenen zeigte in M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>-Empfängermäusen eine bereits starke Durchsetzung mit Myeloblasten und weiteren unreifen Zellen, während eine solche Invasion leukämischer Zellen in den bereits vergrößerten Lebern der M/E-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>-Empfängermäusen erst begann (Abb. 18 c).

Im Einklang mit den *in vitro* erzielten Ergebnissen konnte somit auch *in vivo* belegt werden, dass die Expression von Mef2c die Migration und damit Invasion leukämischer, M/E-transformierter Knochenmarkzellen in hämatopoetische sowie nicht-hämatopoetische Organe beschleunigt.



**Abbildung 18:** Transplantation von je  $1 \times 10^6$  *Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise *Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Linien-negativen Knochenmarkszellen, zu 5% mit MLL/ENL transduziert; (c) Mikroskopische Darstellung von Leberschnitten je einer M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und -*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermaus. In M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Empfängermaus war die lobuläre Leberstruktur bereits durch invasive myeloide M/E-Zellen zerstört, in *Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermaus beginnende Invasion der myeloiden M/E-Zellen im periportalen Bereich (H&E Färbung; Vergrößerung 25x). (d) Mitte, Beispiel eines Blutausstrichs einer M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und -*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermaus. Starke Leukozytose mit unreifen blastenartigen Mono- und Granulozyten in M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Empfängermaus, beginnende Leukozytose in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermaus (Pappenheim-Färbung; Vergrößerung 63x). Darstellung der Leukozytenzahlen/ $\mu$ l aller M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und -*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermäuse im Punktediagramm. Jeder Punkt steht für die Anzahl an Leukozyten in einer untersuchten Maus. Im Mittel liegt die Anzahl der Leukozyten in M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Empfängermäusen mit etwa 90/ $\mu$ l signifikant höher als in M/E-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Empfängermäusen mit etwa 30/ $\mu$ l (p-Werte durch t-Test ermittelt).

## 5.7 Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial von Mef2c

Anhand der bisher aufgeführten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Mef2c den Phänotyp von MLL/ENL-transformierten leukämischen Stammzellen beeinflusst.

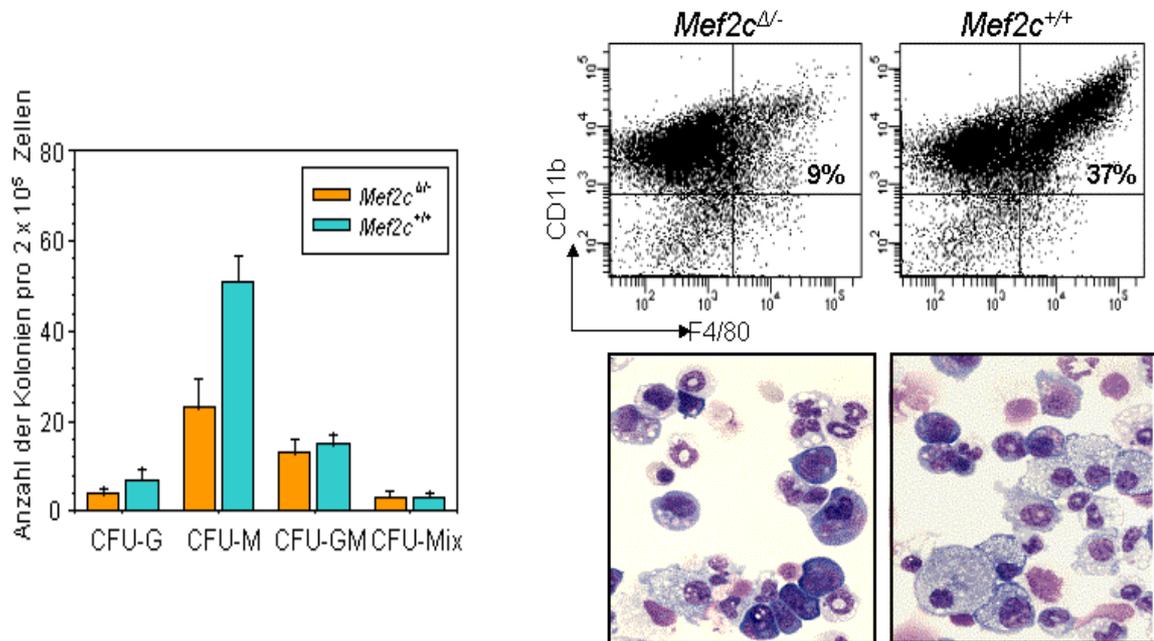
Wie bereits zu Beginn des Ergebnisteils erwähnt, waren die AML-Erkrankungen der Patienten aus den durch den Microarray definierten Gruppen mit Hochregulation des *MEF2C*-Gens durch einen monozytären Phänotyp geprägt (Gruppe 1 FAB M1/M5; Gruppe 10 FAB M1/M5; Gruppe 16 FAB M5/M4). Weiterhin konnte in unserem Labor bereits gezeigt werden, dass die Hochregulation/Überexpression von *Mef2c* einen Einfluss auf den Phänotyp einer im C57Bl/6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mausmodell induzierten AML hat – Entwicklung myeloider Blasten und monozytärer Vorstufen in Knochenmark und Blut, sowie die Invasion leukämischer Zellen in Organe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Mef2c Expression *per se* die Differenzierung früher Knochenmarkszellen beeinflusst.

### 5.7.1 Differenzierungseigenschaften von B6-Mef2c<sup>+/+</sup> versus B6-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup> Knochenmarkzellen *in vitro*

Um die Differenzierungseigenschaften von Mef2c-exprimierenden frühen Knochenmarkzellen mit Mef2c-defizienten Knochenmarkzellen vergleichen zu können, wurde zunächst Knochenmark aus B6-Mef2c<sup>+/+</sup>/MxCre und B6-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup>/MxCre Geschwistermäusen isoliert. 2 x 10<sup>5</sup> dieser Zellen wurden in Methylzellulosemedium ausplattiert, das die monozytäre Entwicklung unterstützt; zur Stimulation der Zellen wurde der Methylzellulose 20 ng/ml Monozyten/Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (M-CSF) zugesetzt. Es wurden zwei unabhängige Experimente, jeweils im Triplet durchgeföhrt. Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der entstanden granulozytären (CFU-G), monozytären (CFU-M), granulozytär/monozytären (CFU-GM) und gemischten (CFU-Mix; enthalten Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten) Kolonien bestimmt. In allen B6-Mef2c<sup>+/+</sup> Ansätzen wurde eine signifikant höhere Anzahl von durchschnittlich 50 monozytären Kolonien verglichen mit durchschnittlich 25 monozytären Kolonien in den B6-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup> Kulturen nachgewiesen (Abb. 19). Die Anzahl aller weiteren Kolonietypen war ohne signifikante Unterschiede (Abb. 19). Zur weiteren Charakterisierung der Zellen aus den Methylzellulosekulturen wurden diese suspendiert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD11b (monozytär exprimiert) und F4/80 (makrophagial exprimiert) gefärbt. In der anschließenden FACS-Analyse bildeten 37% der B6-Mef2c<sup>+/+</sup> Zellen eine Population, die sowohl für CD11b als auch für F4/80 positiv war, dagegen exprimierten nur 9% der B6-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup> Zellen beide Antigene, während der überwiegende Teil dieser Zellen keine F4/80-Expression zeigte (Abb. 19). Eine deutlich stärkere Entwicklung von B6-Mef2c<sup>+/+</sup> Zellen in Makrophagen konnte ebenfalls durch die Untersuchung der Cytospins dieser Zellen belegt werden. Dagegen fanden sich in den Cytospins der differenzierten B6-Mef2c<sup>Δ/Δ</sup> Zellen eine deutlich höhere Anzahl an Granulozyten und Monozyten und nur wenige Makrophagen.

Diese ersten Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial Mef2c-exprimierender verglichen mit Mef2c-defizienten Knochenmarkzellen nach Stimulation mit M-CSF deuten darauf hin, dass Mef2c einen Einfluss auf die Entwicklung von Monozyten beziehungsweise Makrophagen hat.



**Abbildung 19: Colony-Forming-Assays mit B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und -*Mef2c*<sup>-/-</sup> Zellen.** Links, 7 Tage nach Ausplattieren von  $2 \times 10^5$  Zellen in M-CSF supplementierter Methylzellulose war die Anzahl monozytärer Kolonien in B6-*Mef2c*<sup>-/-</sup> Kulturen signifikant vermindert (Triplett-Ansätze). Rechts, die FACS-Analyse suspendierter Zellen aus Methylzellulose zeigte eine signifikant höhere Expression des makrophagialen Oberflächenproteins F4/80 in B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Kulturen. Die verstärkte makrophagiale Entwicklung wurde durch Cytopspins bestätigt (Pappenheim-Färbung, Vergrößerung 100x).

### 5.7.2 Differenzierungseigenschaften von C57Bl/6 Knochenmarkzellen nach Überexpression von *Mef2c* *in vitro*

Zur weiteren Analyse des Einflusses von *Mef2c* auf die Differenzierung früher Knochenmarkzellen wurde Knochenmark aus C57Bl/6 Mäusen entnommen, die das Wildtyp Allel von *Mef2c* tragen. Nach der Anreicherung der Linien-negativen Knochenmarkzellen wurden diese mit gammaretroviralen Pseudotypen transduziert; ein Teil der Zellen wurde so zur Überexpression von *Mef2c* in Verbindung mit eGFP manipuliert, ein weiterer Teil der Knochenmarkzellen exprimierte nur eGFP und diente als Kontrolle. Nach erfolgreicher Infektion der Knochenmarkzellen wurden diese anhand ihrer eGFP-Expression sortiert und wie unter Punkt 5.7.1 beschrieben als Triplettansatz in Methylzellulose ausplattiert.

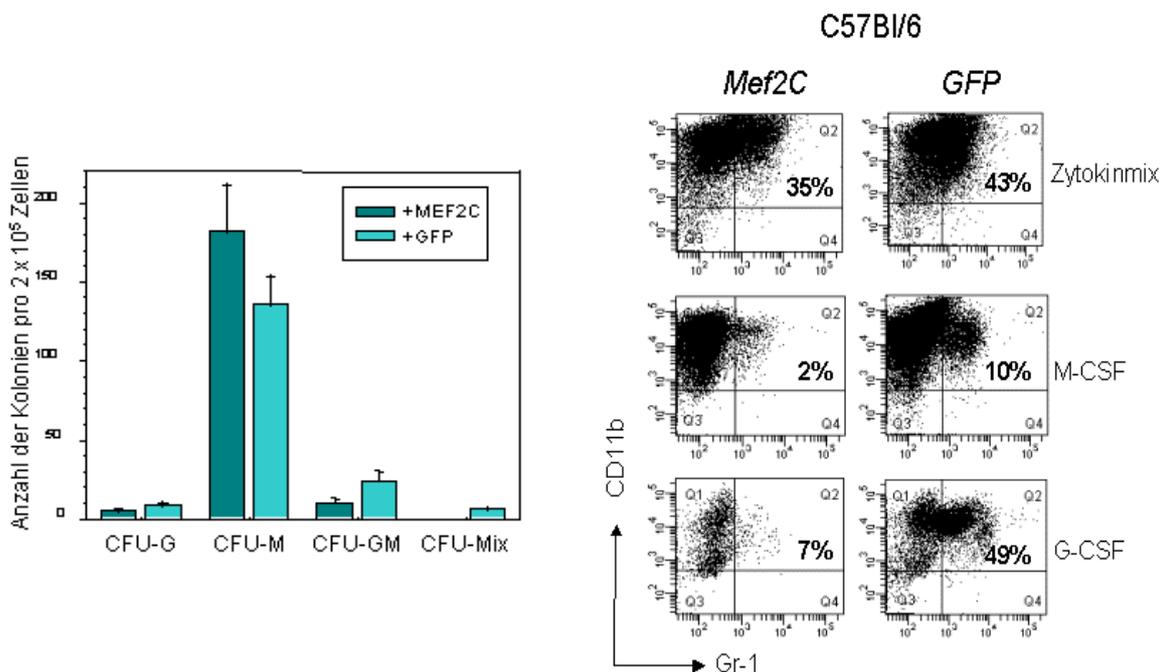
Neben der Methylzellulose, die die monozytäre Entwicklung unterstützt, wurde ein weiterer Triplett-Ansatz in Methylzellulose, die die granulozytäre Entwicklung unterstützt (Zugabe von 20 ng/ml Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor (G-CSF)) und in Methylzellulose, die einen Mix aus den Zytokinen *stem cell factor* (SCF), Interleukin 3 und 6 (IL3, IL6) und Erythropoetin (Epo) enthält, ausplattiert. Dieses Medium unterstützt sowohl die myeloide, als auch die erythroide Differenzierung und wird im Folgenden als Zytokinmix-

Methylzellulose aufgeführt.

Wie unter Punkt 5.7.1 bereits beschrieben erfolgte nach sieben Tagen die Bestimmung der entstandenen Kolonietypen und deren Anzahl. In der eingesetzten Zytokinmix-Methylzellulose wurde für die Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen eine erhöhte Anzahl an monozytären Kolonien (CFU-M) auf durchschnittlich 175 Kolonien im Vergleich zu durchschnittlich 125 CFU-M Kolonien in den eGFP-exprimierenden Kontrollkulturen nachgewiesen (Abb. 20). Die verstärkte Entwicklung der CFU-M in Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen erfolgte auf Kosten der granulozytären Kolonien (CFU-G) und granulozytär/monozytären Kolonien (CFU-GM; Abb. 20). Es konnten keine CFU-Mix Kolonien nachgewiesen werden. Die verminderte Entwicklung granulozytärer Zellen konnte ebenfalls durch eine FACS Analyse suspendierter Zellen aus der Zytokinmix-Methylzellulosekultur bestätigt werden; während 43% der eGFP-exprimierenden Kontrollzellen positiv für Gr-1-Oberflächenexpression getestet werden konnten, waren dies nur 35% innerhalb Mef2c-überexprimierenden Zellen (Abb. 20).

Auch in den Methylzellulosekulturen der B6-Mef2c<sup>+/+</sup> Zellen mit Zusatz von G-CSF oder M-CSF war die Verminderung der CFU-G nachweisbar, was besonders deutlich nach Suspension der Zellen und Untersuchung auf den granulozytären Oberflächenmarker Gr-1 und den monozytären Oberflächenmarker CD11b mit Hilfe des FACS gezeigt werden konnte: Während 49% der eGFP Kontrollkulturen aus der Methylzellulose, die die granulozytäre Entwicklung unterstützt das Oberflächenantigen Gr-1 exprimierten, waren in den Mef2c-überexprimierenden Zellen lediglich 7% der Zellen positiv für Gr-1. Auch die eGFP-Kontrollzellen aus der Methylzellulose, die die monozytäre Entwicklung fördert exprimierten mit 10% mehr Gr-1 als die Mef2c-überexprimierenden Zellen aus den ebenfalls zur monozytären Entwicklung eingesetzten Methylzellulosekulturen (2%, Abb. 20).

Diese Versuche konnten in vier unabhängigen Ansätzen bestätigt werden und lieferten somit einen deutlichen Hinweis darauf, dass die nach Mef2c-Expression und Stimulation nachweisbare verstärkte Differenzierung früher Knochenmarkzellen in Richtung Monozyten/Makrophagen auf Kosten einer Verminderung der Granulopoese von statten geht.



**Abbildung 20: Colony-Forming-Assays mit eGFP- beziehungsweise Mef2c-überexprimierenden, Linien-negativen C57Bl/6 Knochenmarkszellen.** Links, 7 Tage nach Ausplattieren der infizierten Knochenmarkszellen in Zytokin-Mix Methylzellulose konnte eine verminderte Anzahl an monozytären Kolonien in eGFP-Kontrollkulturen nachgewiesen werden (Triplett-Ansätze). Rechts, FACS-Analyse suspendierter Knochenmarkszellen aus Methylzellulose. Unabhängig von der eingesetzten Methylzellulose (supplementiert mit Zytokin-Mix, M-CSF oder G-CSF) war die Anzahl Gr-1-exprimierender Zellen innerhalb der C57Bl/6-Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkszellen vermindert.

## 5.8 Überexpression und Stimulation von Mef2c in Zelllinien

Zur Untersuchung des möglichen Mechanismus, der zu einer verstärkten Monopoese auf Kosten der Granulopoese in Mef2c-(über)exprimierenden Knochenmarkszellen führen könnte, wurde im Folgenden zunächst mit Zelllinien gearbeitet.

### 5.8.1 Expressionslevel von Pu.1, C/ebp $\alpha$ und c-jun nach (Über)expression von Mef2c in der M/E-Zelllinie

Die unter Punkt 5.1.1 beschriebene M/E-Zelllinie kann aufgrund ihres morphologischen und immunohistochemischen Phänotyps als granulozytäre/monozytäre Vorläuferzellen eingeordnet werden. Sie stellt somit eine geeignete Zelllinie zur Untersuchung eines möglichen Differenzierungsmechanismus während der myeloiden Entwicklung dar.

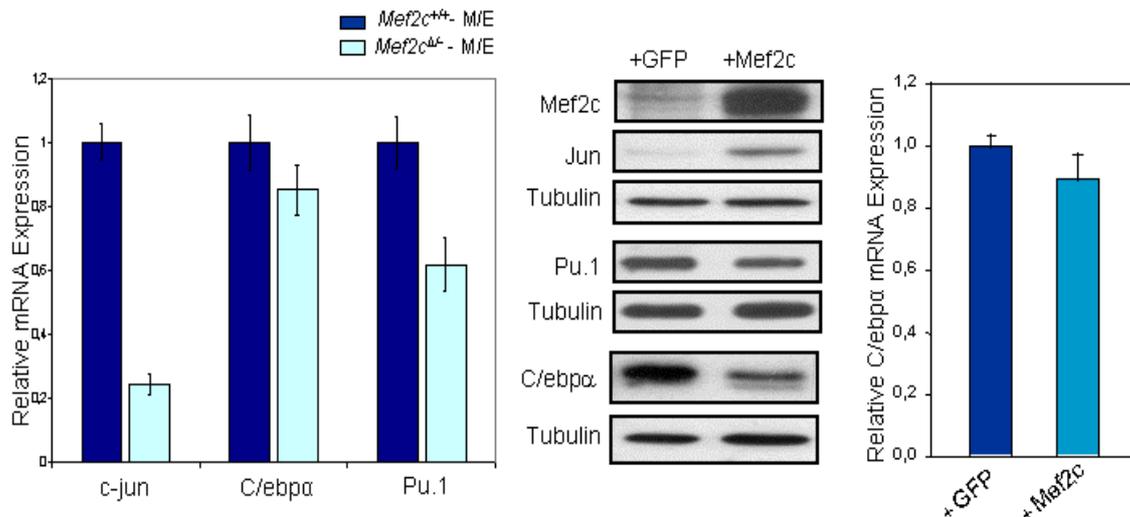
Um einen möglichst physiologischen Differenzierungsstimulus zu erzielen, wurden zunächst je  $1 \times 10^6$  der M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>/CRE-Zellen beziehungsweise M/E-Mef2c<sup>fl/-</sup>/CRE-Zellen intraperitoneal in NOD/scid Mäuse injiziert. Nach 120 Tagen wurden die Mäuse geopfert und

die Untersuchung der Milzen ergab, dass ein großer Teil der injizierten Zellen in dieses Organ eingewandert war (Nachweis durch M/E-assoziierte eGFP-Expressionslevel suspendierter Milzzellen). Ein Teil der Milz wurde den Tieren zur späteren RNA-Isolation entnommen.

Nach Aufarbeitung der mRNA aus den entnommenen Milzen wurden die Expressionslevel der Transkriptionsfaktorgene *Sfp1* (codiert Pu. 1 und wird im Folgenden aus Gründen der Übersicht als solches bezeichnet), *C/ebpa* und *c-jun* durch eine quantitative *real-time* PCR untersucht, da die Expressionslevel dieser Faktoren in der myeloiden Differenzierung eine zentrale Rolle spielen. Zur Normalisierung der Expressionslevel diente die Expressionsstärke des Haushaltsgens *Hprt*, das für die Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase codiert. Dieses Gen wird unabhängig von äußeren Stimuli in den untersuchten Zelllinien gleichbleibend stark exprimiert. Die durchgeführte quantitative *real-time* PCR ergab eine etwa 5-fach geringere *c-jun*-Transkriptmenge in M/E-*Mef2c<sup>fl/-</sup>*/CRE-Milzen verglichen zu den M/E-*Mef2c<sup>+/+</sup>*/CRE-Milzen (Abb. 21). Für *Pu.1* und *C/ebpa* konnte eine nur leicht verminderte Expression in M/E-*Mef2c<sup>fl/-</sup>*/CRE-Milzen nachgewiesen werden (1,1-fach für *C/ebpa*; 1,5-fach für *Pu.1*; Abb.21).

Um zu testen, ob die Expression dieser Transkriptionsfaktoren nach Überexpression von *Mef2c* in M/E-Zellen verändert wird, wurden kultivierte M/E-*Mef2<sup>+/+</sup>*-Zellen mit gammaretroviralen Pseudotypen infiziert, die entweder für *Mef2c* in Verbindung mit eGFP oder für eGFP alleine codierten. Aus diesen Zelllinien wurden nach etwa zweiwöchiger Kultur in Expansionsmedium Proteine isoliert und diese in einer Westernblot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 21 gezeigt, konnte eine signifikante Erhöhung des *c-jun* Proteins in M/E-*Mef2<sup>+/+</sup>*/*Mef2c*-eGFP Zellen im Vergleich zu den M/E-*Mef2<sup>+/+</sup>*/eGFP Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde eine geringe, nicht signifikante Verminderung des *Pu.1* Proteins und eine deutliche Verminderung von *C/ebpa* in M/E-*Mef2<sup>+/+</sup>*/*Mef2c*-eGFP Zellen beobachtet. Als Kontrolle der in der SDS-PAGE aufgetragenen Proteinmenge diente Tubulin (Bestandteil des Zytoskeletts), das vergleichbar zu *Hprt* immer in gleichen Mengen in der Zelle vorliegt. Die verminderte Expression von *C/ebpa* konnte durch *real-time* PCR auf Transkriptionsebene nicht verifiziert werden, was auf eine Regulation des Proteins auf Translations- oder Proteinebene schließen lässt.

Mit diesen Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass der bZIP Transkriptionsfaktor *c-jun* in *Mef2c*-(über)exprimierenden granulozytären/monozytären M/E-Zellen verstärkt exprimiert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *Mef2c*-Expression die Transkript- und Protein-Level von *Pu.1* nicht beeinflusst, während dies nur für das Transkript-Level von *C/ebpa* ebenfalls der Fall ist. Auf Proteinebene wird in *Mef2c*-überexprimierenden M/E-Zellen deutlich weniger *C/ebpa* detektiert als in den eGFP-exprimierenden M/E-Kontrollzellen.



**Abbildung 21: Untersuchung der Transkript- und Proteinmenge der myeloiden Transkriptionsfaktoren c-jun, Pu.1 und C/ebpa in der M/E-Zelllinie.** Links, relative mRNA-Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren, ermittelt durch *real-time* PCR. In M/E-Mef2c<sup>-/-</sup>/CRE-Milzzellen wird signifikant weniger c-jun exprimiert, verglichen zu M/E-Mef2c<sup>+/+</sup>/CRE-Milzzellen. Die Expression des C/ebpa- und Pu.1-codierenden Gens ist nur geringfügig vermindert. Normalisierung der Expressionslevel durch Messung der Expressionsstärke des Haushaltsgens *Hprt*. Mitte, die Western blot-Analyse der Proteinlysate aus M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen, die durch SDS-PAGE (8,5%) aufgetrennt wurden, zeigte eine deutlich stärkere Expression des c-jun Proteins (43 kDa) verglichen zu M/E-eGFP-Kontrollzellen. Die Expression von Pu.1 (40 kDa) ist nicht durch Mef2c beeinflusst, die Menge des C/ebpa-Proteins (42 kDa) ist in M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen deutlich vermindert. Als Ladekontrolle der Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen das Zytoskelettprotein Tubulin (60 kDa) eingesetzt. Rechts, keine Verminderung der C/ebpa-Transkriptmenge in M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen legte eine Regulation auf Proteinebene nahe.

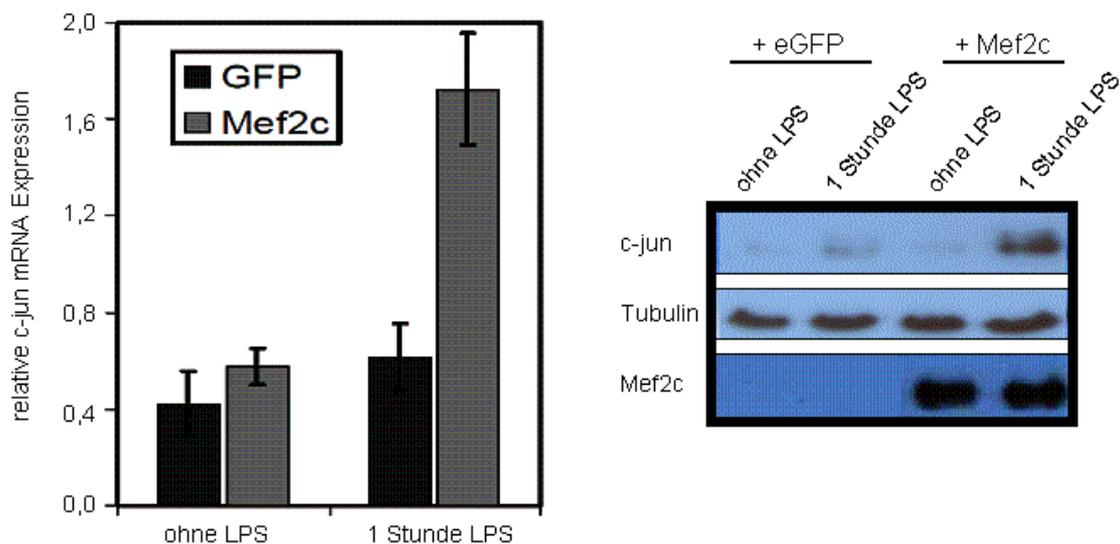
### 5.8.2 Der basische ZIP-Transkriptionsfaktor c-jun ist ein wichtiges Zielgen des Transkriptionsfaktors Mef2c

Um die Beobachtung der erhöhten c-jun Expression in Mef2c-exprimierenden Zellen in einer weiteren myeloiden Zelllinie zu verifizieren, wurden FDCP-1 Zellen genutzt. Diese wurden zunächst durch Infektion mit Mef2c-eGFP codierenden Gammaretroviren zur Mef2c Überexpression manipuliert. Als Kontrolle dienten entsprechend mit eGFP-codierenden Gammaretroviren transduzierte FDCP-1-Zellen. Im Anschluß an die Infektion erfolgte eine *in vitro* Stimulation der Zellen mit dem in der Zellwand von gram-negativen Bakterien vorkommenden Molekül Lipopolysaccharid (LPS). Dies sollte in der Folge die p38 MAP-Kinase Signalkaskade aktivieren, wovon Mef2c ein Zielprotein darstellt. Weiterhin wird postuliert, dass Mef2c in phosphorylierter Form die Transkription von *c-jun* aktivieren kann. Um dies zu testen, wurden die FDCP-1/Mef2c-eGFP beziehungsweise FDCP-1/eGFP Zellen eine Stunde nach Zugabe von 10 ng/ml LPS zur mRNA- und Proteinisolation geerntet. Die Untersuchung der c-jun Transkriptmenge durch quantitative *real-time* PCR zeigte eine deutliche, etwa 2,4-fache Hochregulation der c-jun-mRNA in LPS-stimulierten Mef2c-transduzierten FDCP-1 Zellen verglichen zu einer nur um das 1,5-fache hochregulierten Expression von *c-jun* in den mit dem eGFP-Vektor infizierten und ebenfalls LPS-stimulierten

FDCCP-1 Kontrollzellen (Abb. 22). Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde zusätzlich das Expressionslevel des Haushaltsgens *Hprt* bestimmt.

Die Untersuchung der Proteinlysate dieser Zellen durch eine Westernblot-Analyse zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der c-jun Proteinmenge in FDCCP-1/Mef2c Zellen nach Inkubation für eine Stunde in 10 ng/ml LPS verglichen mit einer nur gering gesteigerten c-jun Proteinexpression in den gleichermaßen behandelten FDCCP-1/eGFP Kontrollzellen (Abb. 22). Wie bereits für die Westernblot-Analysen der M/E-Zellen unter Punkt 5.8.1 beschrieben, wurde als Kontrolle der in der SDS-PAGE aufgetragenen Proteinmenge ein Antikörper gegen Tubulin eingesetzt.

Zusammengefasst bestätigten die *real-time* PCR und Westernblot Ergebnisse, dass die Überexpression von Mef2c in myeloiden Zelllinien zur Hochregulation von c-jun führt.



**Abbildung 22: Mef2c-assoziierte Hochregulation von c-jun nach LPS-Stimulation der myeloiden FDCCP-1 Zelllinie.** FDCCP-1/Mef2c-eGFP- und /eGFP-Zellen wurden für eine Stunde in 10 ng/ml LPS inkubiert. Links, die Untersuchung der c-jun-mRNA-Menge durch *real-time* PCR vor und nach LPS-Stimulation zeigte eine signifikant stärkere *c-jun*-Hochregulation in Mef2c-überexprimierenden FDCCP-1-Zellen. Zur Normalisierung wurde die Expressionsstärke von *Hprt* gemessen. Rechts, die Auftrennung der Proteinlysate durch SDS-PAGE (8,5%) und anschließende Untersuchung durch Westernblot-Analyse bestätigte die Hochregulation von c-jun auch auf Proteinebene. Als Ladeprotein wurde die Membran mit einem Antikörper gegen das Zytoskelettprotein Tubulin inkubiert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Mef2c (44 kDa) wurde die Überexpression des Proteins im Vergleich zu FDCCP1/eGFP-Kontrollzellen bestätigt.

## 5.9 Überexpression von c-jun in Knochenmarkstammzellen

Da die bisher gezeigten Ergebnisse einen deutlichen Hinweis darauf liefern, dass Mef2c das Expressionslevel von c-jun zumindest in myeloiden Zelllinien beeinflusst, wurde im Folgenden untersucht, wie sich die Überexpression von c-jun in frühen Knochenmarkszellen äußert.

### 5.9.1 Die Überexpression von c-jun in frühen Knochenmarkzellen inhibiert die Granulopoese

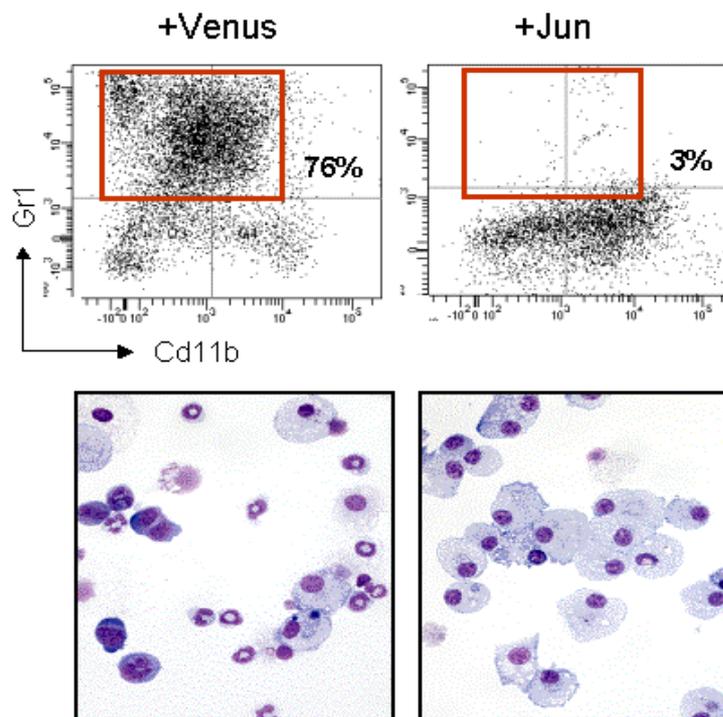
Zur Überexpression von c-jun wurden Linien-negative Knochenmarkzellen aus C57Bl/6-Mäusen mit c-jun-Venus (GFP-Variante mit leicht veränderter Fluoreszenz Emmission; <sup>86</sup>Shaner *et al.*, 2005) codierenden gammaretroviralen Pseudotypen infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Viren infiziert wurden, von denen lediglich das Reporter-gen *Venus* exprimiert wurde. Nach der Infektion des Knochenmarks wurden die Venus-positiven Zellen sortiert und je  $2,2 \times 10^4$  dieser Zellen in Zytokinmix-Methylzellulose beziehungsweise Methylzellulose, die die monozytäre Entwicklung unterstützt, ausplattiert.

Nach sieben Tagen wurde zunächst die Anzahl der Kolonien ausgezählt, wobei die Kolonietypen nicht unterschieden wurden. Während in den Venus-Kontroll-Knochenmark-Kulturen aus der Zytokinmix-Methylzellulose sehr viele Kolonien entstanden waren (über 500), wurden in der entsprechenden Methylzellulose mit den c-jun-Venus infizierten Knochenmarkzellen durchschnittlich 20 Kolonien gezählt. In der M-CSF supplementierten Methylzellulose konnten durchschnittlich 454 Kolonien in den Venus-Kontroll-Kulturen gezählt werden, während im Schnitt lediglich 47 Kolonien in den c-jun-Venus-Kulturen nachweisbar waren. In einem identischen zweiten, unabhängigen Experiment war die Anzahl der entstandenen Kolonien vergleichbar.

Die den Methylzellulosekulturen entnommenen und suspendierten Zellen wurden im Anschluss jeweils für eine FACS-Analyse mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die myeloid exprimierten Oberflächenproteine Gr-1 (granulozytär exprimiert) und CD11b (monozytär/makrophagial exprimiert) gefärbt. Ein weiterer Teil der Knochenmarkzellen wurde zur morphologischen Untersuchung auf Objektträger zentrifugiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt, konnte mit Hilfe der FACS-Analyse in den Venus-Kontrollkulturen eine Zell-Population detektiert werden, die eine starke Expression von Gr-1 aufweist, aber eine sehr verminderte bis hin zu keiner Expression von CD11b (76%, Abb. 23 links). Im Gegensatz dazu exprimierten die zur c-jun Überexpression manipulierten Knochenmarkzellen fast ausschließlich CD11b, während nur noch 3% der Zellen ebenfalls wie für die Venus-Kontrollzellen beschrieben Gr-1 stark und CD11b niedrig beziehungsweise nicht exprimierten (Abb. 23, rechts). Die Entwicklung der Zellen war in beiden Arten der eingesetzten Methylzellulose vergleichbar, dargestellt sind Zellen aus Zytokinmix-Methylzellulose, da aufgrund der starken Ausdifferenzierung der c-jun-Venus infizierten Knochenmarkzellen in der Methylzellulose, die die monozytäre Entwicklung fördert, zu wenig Zellen für die FACS-Analyse vorhanden waren. Die mikroskopische Analyse der Cytospins zeigte die exklusive Entwicklung der c-jun-exprimierenden Zellen in Makrophagen, während in den Kontrollkulturen reife Granulozyten, Monozyten und Makrophagen detektiert werden konnten.

(Abb. 23).

Dieses Ergebnis entsprach den *in vitro* Beobachtungen nach der (Über)expression von Mef2c in B6-Knochenmarkzellen (siehe Abschnitte 5.7.1 und 5.7.2) und war somit ein weiterer Hinweis darauf, dass die verstärkte Monopoese auf Kosten der Granulopoese dieser Zellen durch die Hochregulation der *c-jun* Expression aufgrund erhöhter Mef2c Aktivität ausgelöst ist.



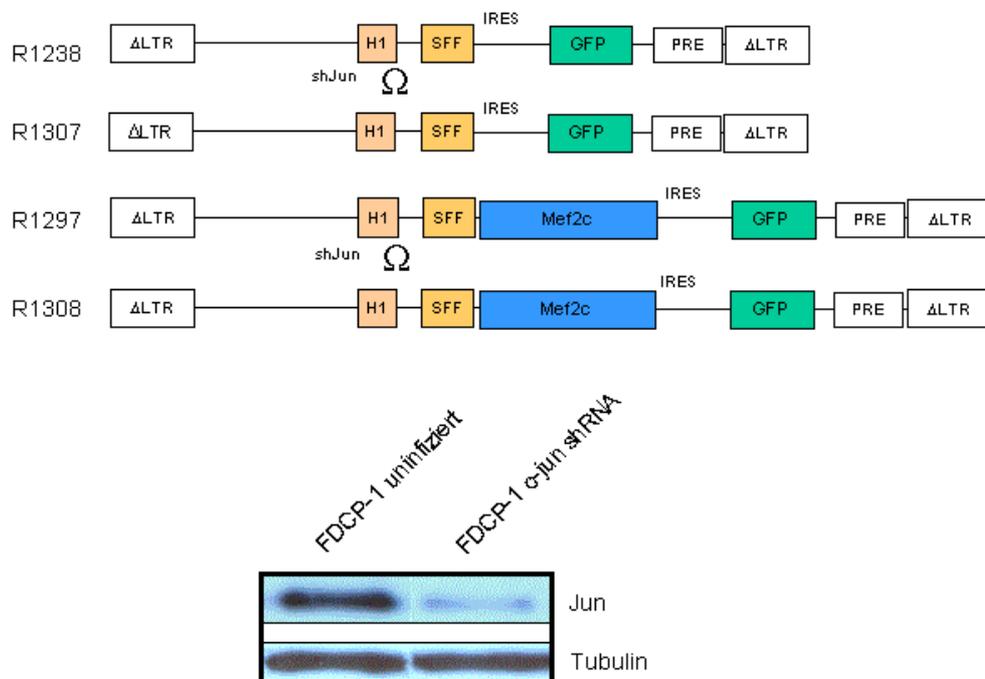
**Abbildung 23: Colony-Forming-Assays mit Venus- beziehungsweise c-jun-überexprimierenden, Linien-negativen C57Bl/6-Knochenmarkzellen.** Oben, gezeigt ist ein FACS-analytisches Beispiel suspendierter, manipulierter Knochenmarkzellen 7 Tage nach Ausplattieren in Zytokin-Mix-Methylzellulose. In der Venus-Kontrollkultur konnte im Gegensatz zu den c-jun-überexprimierenden Knochenmarkzell-Kulturen eine hohe Anzahl an Zellen detektiert werden, die das granulozytäre Oberflächenprotein Gr-1 exprimierten. Unten, die Cytospins bestätigten die Ausreifung von Granulozyten, Monozyten und wenigen Makrophagen in den Venus-Kontrollkulturen, während in den c-jun-überexprimierenden Methylzellulosekulturen ausschließlich Makrophagen detektiert werden konnten (Pappenheim-Färbung, Vergrößerung 40x).

### 5.10 Überexpression von Mef2c in Verbindung mit einer c-jun shRNA in Knochenmarkstammzellen

Ist die verminderte, Mef2c-assoziierte, granulozytäre Differenzierung früher Knochenmarkzellen tatsächlich durch die Aktivierung und Hochregulation von *c-jun* ausgelöst, so sollte eine Herunterregulation von c-jun in Mef2c-überexprimierenden Zellen zur Reversion dieses Phänotyps führen. Um dies zu testen erfolgte eine parallele Überexpression von Mef2c und Herunterregulation von c-jun in frühen Knochenmarkzellen. Wie in Abbildung 24 gezeigt wurden verschiedene lentivirale Konstrukte eingesetzt; alle aufgeführten Konstrukte codieren für das Reportergen *eGFP* zur Identifikation transduzierter

Zellen. Das Konstrukt R1297 codiert zusätzlich für *Mef2c*, das Konstrukt R1307 für eine shRNA, die gezielt gegen das *c-jun* Transkript gerichtet ist und das Konstrukt R1308 codiert für die Kombination aus *Mef2c* und c-jun-shRNA.

Die Funktionalität der shRNA wurde zunächst durch Infektion der Konstrukte R1238 (eGFP) beziehungsweise R1307 in FDCP-1/Mef2c Zellen getestet. Die manipulierten Zellen wurden für eine Stunde in LPS-haltigem Medium inkubiert und im Anschluss für die Proteinisolierung geerntet. Die Westernblot-Analyse bestätigte die erfolgreiche Herunterregulation des c-jun Transkriptionsfaktors auf etwa 30% des „normalen“ Expressionslevels in FDCP-1/Mef2c Zellen, die mit der shRNA gegen c-jun infiziert waren (Abb. 24).



**Abbildung 24: Schematische Darstellung lentiviraler LeGO-iG Konstrukte zur eGFP- und Mef2c/eGFP-Expression, mit und ohne c-jun-shRNA, sowie die Funktionalität der c-jun-shRNA in FDCP-1-Zellen.** Oben, R1238: eGFP Kontrollvektor, R1307: Vektor zur Expression von eGFP und c-jun-shRNA, R1297: Vektor zur Überexpression von Mef2c in Verbindung mit eGFP, R1308: Vektor zur gleichzeitigen Überexpression von Mef2c/eGFP und Herunterregulation von c-jun durch Expression der entsprechenden shRNA. Die Mef2c und eGFP Expression wird durch einen Enhancer/Promotor aus dem gammaretroviralen *spleen focus-forming virus* (SFFV) reguliert, die shRNA-Expression wird durch den murinen H1-Promotor reguliert. Unten, Westernblot-Analyse von Proteinlysaten aus FDCP-1/Mef2c-exprimierenden Zellen, die mit R1238 (Kontrolle) beziehungsweise R1307 (c-jun-shRNA) infiziert und eine Stunde in 10 ng/ml LPS inkubiert waren, bestätigten die Funktionalität der c-jun-shRNA. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen das Zytoskelettprotein Tubulin.

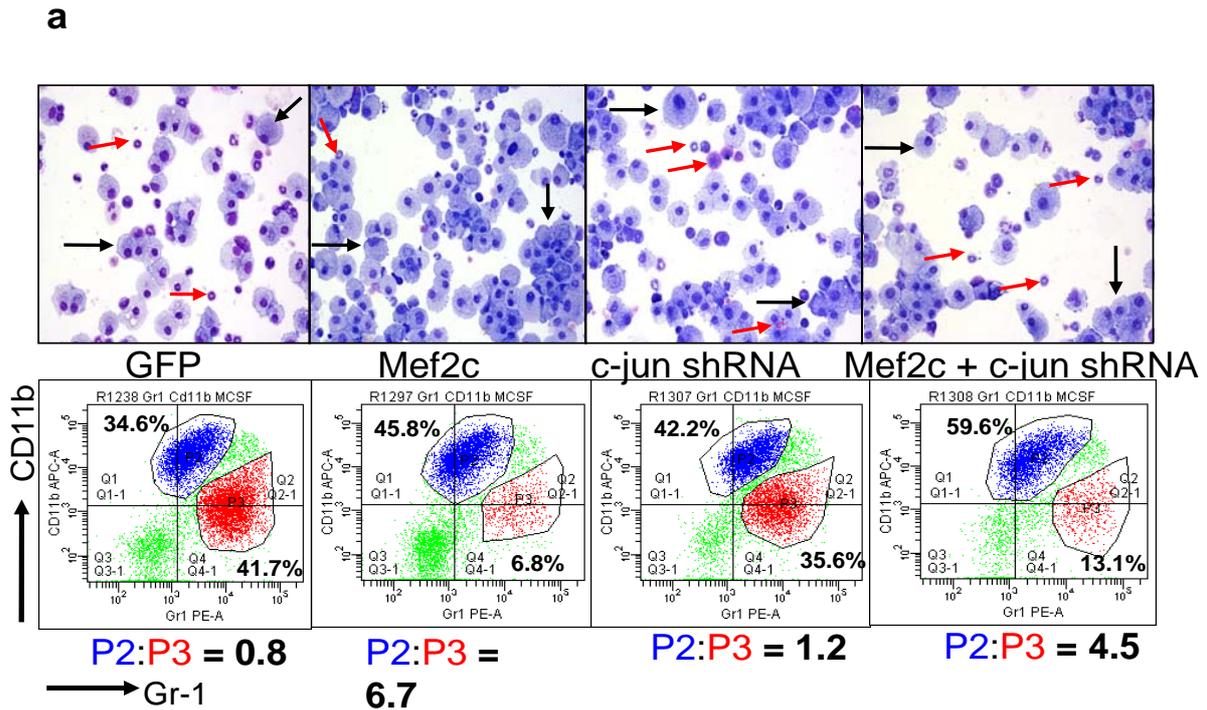
### 5.10.1 Der Mef2c-assoziierte granulozytäre Differenzierungsblock wird durch die Herunterregulation von c-jun teilweise aufgehoben

Im Anschluss wurden Linien-negative Knochenmarkzellen mit den oben

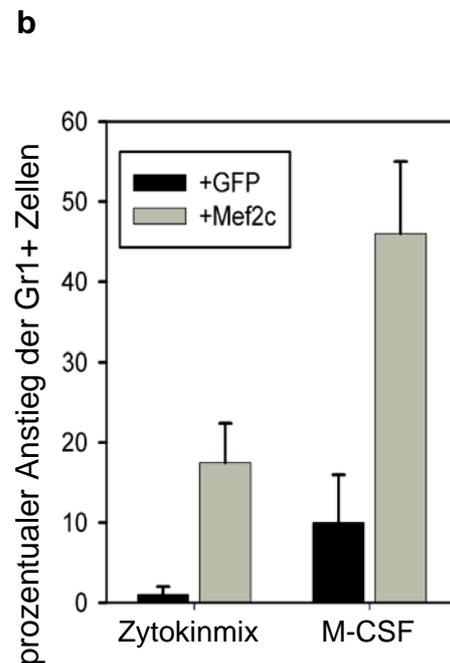
beschriebenen Konstrukten transduziert, auf eGFP-Expression sortiert und in zwei unabhängigen Experimenten  $1 \times 10^4$  beziehungsweise  $2 \times 10^4$  Zellen in Methylzellulose (mit Zytokinmix oder M-CSF zur monozytären Differenzierung) ausplattiert. Die Zellen der Kolonien, die sich nach sieben Tagen entwickelt hatten wurden zur Charakterisierung der entstandenen Zellformen mit Hilfe einer FACS-Analyse suspendiert und mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die myeloiden Oberflächenmarker Gr-1 und CD11b gefärbt. Ein weiterer Teil der Zellen wurde auf Objektträger zur morphologischen Untersuchung zentrifugiert.

Die dargestellte FACS-Analyse zeigt Zellen aus Methylzellulosekulturen, denen M-CSF zugesetzt war. Die detektierten Zellpopulationen können aufgrund der Expression der Oberflächenproteine Gr-1 und CD11b in zwei distinkte Populationen eingeteilt werden. Überwiegend Gr-1 positive, CD11b niedrig/negative Zellen entsprechen einem granulozytären Phänotyp (P3, Abb. 25 a), während überwiegend Gr-1 niedrig/negative aber CD11b positive Zellen einem eher monozytären/makrophagialen Phänotyp (P2, Abb. 25 a) entsprechen. Während sich in den Methylzellulosekulturen der Knochenmarkzellen, die entweder mit dem Reporter gen allein, oder mit der c-jun-shRNA infiziert waren, Zellen beider Linien mehr oder weniger im Verhältnis 1:1 entwickelten (Abb. 25 a), wurden in den Methylzellulosekulturen der Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen 6,7 mal mehr Monozyten/Makrophagen als granulozytäre Formen ausgebildet (Abb. 25 a). Dies konnte ebenfalls durch die mikroskopische Untersuchung der Cytospins bestätigt werden, bei der fast exklusiv Makrophagen detektiert wurden (Abb. 25 a, schwarze Pfeile). Knochenmarkzellen, in denen sowohl Mef2c überexprimiert wurde, als auch c-jun aufgrund der shRNA herunterreguliert war, wiesen ebenfalls eine 4,5-fach erhöhte Zahl an Makrophagen auf (Abb. 25 a). Allerdings konnte in diesen Kulturen auch eine wieder steigende Anzahl an Gr-1 positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25 a). Die Entwicklung reifer Granulozyten konnte hier ebenfalls durch die mikroskopische Begutachtung der Cytospins bestätigt werden (Abb. 25 a, rote Pfeile in Cytospin). Auch die Quantifizierung der Daten aus den FACS-Analysen beider Methylzelluloseansätze (Zytokinmix-Methylzellulose beziehungsweise Methylzellulose mit M-CSF) zeigte die wieder verstärkte granulozytäre Entwicklung (Erhöhung der Gr-1 Expression) der Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen mit shRNA gegen c-jun (Abb. 25 b, Balkendiagramm).

Mit Hilfe dieser c-jun-shRNA assoziierten Experimente konnte somit abschließend *in vitro* gezeigt werden, dass die Hochregulation des bZIP Transkriptionsfaktors c-jun aufgrund erhöhter Mef2c Aktivität tatsächlich zur Verstärkung der monozytären/makrophagialen Entwicklung auf Kosten von Granulozyten beiträgt.



**Abbildung 25: Colony-Forming-Assays Linien-negativer C57Bl/6-Knochenmarkzellen nach Infektion mit lentiviralen LeGO-iG Konstrukten zur Expression von eGFP- beziehungsweise Mef2c, mit und ohne c-jun-shRNA.** (a) FACS-analytische Beispiele und Cytospins je eines Ansatzes von Methylzellulose-Kulturen aus M-CSF-supplementierter Methylzellulose. Sowohl die suspendierten Zellen aus der eGFP-Kontrollkultur, als auch aus der Kultur mit c-jun-shRNA zeigten in der FACS-Analyse und im Cytospin eine Entwicklung von Granulozyten (P3) und Monozyten (P2) etwa im Verhältnis 1:1. Im Fall der Mef2c-überexprimierenden Zellen wurde durch beide Untersuchungsmethoden eine signifikant erhöhte Anzahl an monozytären Zellformen detektiert. Im Cytospin konnten diese als Makrophagen identifiziert werden (schwarze Pfeile). Im Fall der zur gleichzeitigen Mef2c-Überexpression und Herunterregulation von c-jun manipulierten Zellen aus Methylzellulose konnte eine wieder etwas erhöhte Anzahl granulozytärer Zellen (rote Pfeile) durch beide Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden. (Pappenheim-Färbung, Vergrößerung 40x) (b) Die Quantifizierung der prozentualen, durch FACS-Analyse gemessenen Gr-1-Expression zeigte, dass im Fall der gleichzeitigen Mef2c-Überexpression und Herunterregulation von c-jun der Anteil an Gr-1 positiven Zellen signifikant stärker anstieg verglichen mit Zellen, die nur die c-jun-shRNA exprimierten.



### 5.11 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich anhand der hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass der MADS-box Transkriptionsfaktor Mef2c in MLL/ENL-transformierten, leukämischen Stammzellen zu einer Veränderung des Phänotyps beiträgt. In den durchgeführten Versuchen korrelierte die Mef2c-Expression mit erhöhter Migrationskapazität *in vitro* und *in vivo* und verstärkter Befähigung zum Homing *in vivo*.

Dieser Phänotyp war assoziiert mit einer vergrößerten Cxcr4-exprimierenden Subpopulation innerhalb M/E-Mef2c-exprimierender Zellen. Weiterhin konnte eine verstärkte Expression von Chemokin- (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl6*) und Chemokinrezeptor-Genen (*Ccr2*, *Ccr5*), sowie Matrixmetalloprotease-Genen (*Mmp8*, *Mmp12*, *Mmp25*) identifiziert werden.

Zusätzlich spielt Mef2c eine zentrale Rolle in der physiologischen Differenzierung granulozytärer/monozytärer Vorläuferzellen in Monozyten/Makrophagen auf Kosten der Granulopoese. Diese Differenzierungseigenschaft ging mit der Hochregulation des bZIP Transkriptionsfaktors c-jun einher und stand im Zusammenhang mit äußeren Stimuli, die die myeloide Entwicklung beeinflussen (zum Beispiel Monozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) oder Lipopolysaccharid (LPS)).

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Rolle des MADS-box Transkriptionsfaktors Mef2c für die Hämatopoese und Leukämogenese näher charakterisiert werden, nachdem erste Hinweise auf eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen hindeuteten.

Die Funktion der Mef2-Proteinfamilie war zu Beginn dieser Arbeit sehr gut in Bezug auf Entwicklungsprozesse im Muskelgewebe von Vertebraten und *Drosophila melanogaster*, sowie während der neuronalen Entwicklung charakterisiert (zusammengefasst in <sup>65</sup>Black und Olson, 1998; <sup>87</sup>Mao *et al.*, 1999; <sup>88</sup>Mao und Wiedmann, 1999). Die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf eine mögliche Funktion des Transkriptionsfaktors Mef2c in der Hämatopoese/Leukämogenese basierte auf dem Nachweis der Hochregulation von *MEF2C* in AML-Patientenproben. Eine entsprechende gesamtgenomische Expressionsanalyse wurde uns freundlicherweise von P. Valk und R. Delwel zur Verfügung gestellt (<sup>60</sup>Valk *et al.*, 2004). Die erhöhte *MEF2C* Expression war in drei distinkten Patientengruppen mit ähnlichem Genexpressionsprofil und nach FAB-Klassifizierung myeloidem/monozytärem AML-Phänotyp nachweisbar. Weiterhin konnte eine positive Korrelation zwischen der *MEF2C* Hochregulation und Translokationen des *MLL*-Gens in zwei dieser Gruppen identifiziert werden. Zusätzlich wurde *Mef2c* in unserem Labor als *common integration site* in AML identifiziert, die durch Infektion von C57Bl/6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Moloney murinen Leukämievirus induziert wurden. Die Überexpression von *Mef2c* in diesem Mausstamm führte zur Entwicklung einer aggressiven AML nach einer mittleren Latenzzeit von nur 79 Tagen (M. Schwieger und C. Stocking, nicht publiziert).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Mef2c-Expression in (1) durch das Fusionsprotein MLL/ENL transformierten leukämischen Knochenmarkzellen, sowie in (2) nicht-transformierten gesunden Knochenmarkzellen sollen im Folgenden vergleichend mit Hypothesen und bereits etablierten Modellen zur Hämatopoese und Leukämogenese, speziell der MLL-assoziierten Leukämien, diskutiert werden.

### 6.1 Mef2c ist für den MLL/ENL-assoziierten Transformationsprozess nicht erforderlich

Mit Hilfe des MLL/ENL Fusionsproteins, welches das Produkt der *MLL*-Translokation zwischen Chromosom 11 (*MLL*-Lokus) und Chromosom 19 (*ENL*-Lokus) darstellt, ist es möglich, hämatopoetische Stammzellen, sowie myeloide Vorläuferzellen *in vitro* vollständig zu immortalisieren (<sup>52</sup>Lavau *et al.*, 1997; <sup>53</sup>Zeisig *et al.*, 2003; <sup>55</sup>Cozzio *et al.*, 2003). Diese M/E-transformierten Zellen weisen meist einen myeloiden Phänotyp auf, unabhängig davon welche Zellpopulation für die Immortalisierung mit MLL/ENL verwendet wurde. Wichtige Modulatoren für diesen Transformationsprozess sind *Hox*-Gene (<sup>56</sup>Ayton und Cleary, 2003;

<sup>55</sup>Cozzio *et al.*, 2003), deren Expressionsprofil durch MLL und dessen Fusionsproteine induziert und erhalten wird (<sup>48</sup>Milne *et al.*, 2002; <sup>89</sup>Yu *et al.*, 1995).

In einer ersten Versuchsreihe zur möglichen Rolle von Mef2c während des Transformationsprozesses von Linien-negativen Knochenmarkzellen durch das Fusionsprotein MLL/ENL sollte herausgefunden werden, ob Mef2c (1) für die Transformation *per se* und/oder (2) für die Erhaltung des immortalisierten Phänotyps wichtig ist. In beiden Ansätzen zeigte sich, dass mit Hilfe von MLL/ENL eine immortalisierte Knochenmarkzelllinie unabhängig von der Expression von *Mef2c* etabliert und erhalten werden kann. Die resultierenden Zelllinien exprimierten die myeloiden Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b und wiesen einen Phänotyp auf, der myeloiden Vorläuferzellen entsprach. Dies unterschied sich von dem in <sup>55</sup>Cozzio *et al.* (2003) beschriebenen Phänotyp der durch MLL/ENL transformierten Knochenmarkzellen geringfügig: die in deren Studie etablierten Zelllinien exprimierten das granulozytäre Oberflächenprotein Gr-1 nur noch schwach und zeigten einen bereits etwas stärker monozytär differenzierten Phänotyp. Dabei spielte es keine Rolle, welche Zellfraktion für die Transformation durch MLL/ENL eingesetzt wurde (hämatopoetische Stammzellen (HSZ), gesamte myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors* CMP) oder granulozytäre/monozytäre Vorläuferzellen (*granulocyte/monocyte progenitors* GMP)). Die Differenzierung der Knochenmarkzellen aus unseren Transformationsversuchen scheint also zu einem etwas früheren Zeitpunkt der Entwicklung blockiert zu sein.

Die hier erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Mef2c* kein direktes Zielgen von MLL/ENL im Zusammenhang mit dessen Potenzial zur leukämischen Transformation von Knochenmarkzellen darstellt, was allerdings für ein anderes MLL-Fusionsprotein – MLL/AF9 – postuliert wird (<sup>57</sup>Krivtsov *et al.*, 2006). Als mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte natürlich eine unterschiedliche biologische Funktion der in unseren Experimenten und deren Experimenten verwendeten MLL-Fusionsproteine (MLL/ENL vs. MLL/AF9) angenommen werden. Dies wurde bereits früher von <sup>90</sup>Kumar *et al.* (2004) in Betracht gezogen, da in deren Studien *HoxA9* nicht als direktes Zielgen von MLL/AF9 identifiziert wurde, während <sup>56</sup>Ayton und Cleary (2003) dies für MLL/ENL transformierte Knochenmarkzellen postulierten. Hier erscheint jedoch der sehr unterschiedliche experimentelle Aufbau der Versuche als mögliche Ursache nahe liegender zu sein. Während Kumar *et al.* die MLL/AF9 Expression durch eine knock-in Strategie in Knochenmarkzellen erreichten, wurden von Ayton und Cleary die Knochenmarkzellen durch retrovirale Infektion mit MLL/ENL-codierenden Pseudotypen immortalisiert. Letzteres führt zu einer stärkeren Expression des Fusionsproteins, da das entsprechende codierende Gen unter Kontrolle eines viralen anstelle eines endogenen Promotors wie nach knock-in, steht. Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse erscheint deshalb schwierig. Trotzdem ist es

unwahrscheinlich, dass unterschiedliche MLL-Fusionsproteine unterschiedliche Zielgene aktivieren. Dies wird aufgrund der Tatsache deutlich, dass sowohl die Wildtyp-Form von MLL, als auch dessen Fusionsproteine in einem großen Proteinkomplex vorliegen. Die Interaktionspartner in diesen Komplexen übernehmen überwiegend enzymatisch identische Funktionen, unabhängig von der Form, in der MLL vorliegt. Die Fusionspartner von MLL scheinen daher eher zur aberranten Expression der Zielgene beizutragen, anstatt einen Einfluss auf deren Identität zu nehmen (<sup>91</sup>Yokoyama *et al.*, 2005, sowie persönliche Kommunikation mit R. Slany).

Da der experimentelle Aufbau der hier durchgeführten Untersuchungen indentisch mit denen von <sup>57</sup>Krivtsov *et al.* (2006) ist – retrovirale Infektion der Knochenmarkzellen mit MLL-Fusionsproteinen – müssen die durchgeführten Experimente genauer betrachtet werden. Die Hypothese, dass *Mef2c* ein direktes Zielgen von MLL/AF9 im Transformationsprozess darstellt, wurde beruhend auf dem Befund aufgestellt, dass die Expression von *Mef2c* sehr schnell nach Transformation von GMPs mit MLL/AF9 hochreguliert wird. Zur experimentellen Bestätigung wurden leukämische GMPs mit einer shRNA zur Herunterregulation der *Mef2c* Expression infiziert. In Methylzellulose-Assays konnte dadurch zwar eine Verminderung der Kolonie-Anzahl und -Größe nachgewiesen werden, allerdings wurden keine Replattierungs-Versuche vorgenommen, die tatsächlich bestätigen könnten, dass nach Herunterregulation von *Mef2c* keine neuen Kolonien mehr gebildet werden und somit keine leukämische Transformation der GMPs stattgefunden hat. Durch solche Replattierungen wurden die für diese Arbeit verwendeten MLL/ENL-Zelllinien, unabhängig vom Genotyp, etabliert. In weiteren Experimenten von Krivtsov *et al.* sollte gezeigt werden, dass *Mef2c* wichtig für die Erhaltung des leukämischen Phänotyps der MLL/AF9 transformierten Knochenmarkzellen ist. Dazu wurden die *Mef2c*-shRNA infizierten leukämischen GMPs der Methylzellulose entnommen und in sublethal bestrahlte Mäuse transplantiert. Innerhalb von 120 Tagen wurden lediglich 20% der Empfängertiere krank, die mit leukämischen, *Mef2c*-shRNA exprimierenden GMPs transplantiert waren, im Gegensatz zu 56% der Empfängertiere, die mit leukämischen GMPs ohne *Mef2c*-shRNA-Expression transplantiert waren. Der weitere Verlauf dieses Transplantationsexperimentes ist allerdings nicht gezeigt, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass letztendlich alle transplantierten Tiere an einer Leukämie erkrankt und verstorben sind und lediglich die Latenzzeit bis zum Ausbruch der Leukämie durch die Herunterregulation der Expression von *Mef2c* verlängert wurde. Dies würde wiederum mit unseren Beobachtungen übereinstimmen, wie später noch beschrieben wird. Neuere Untersuchungen der gleichen Gruppe mit humanen MLL-assoziierten leukämischen Zelllinien und Proben aus AML-Patienten zeigen, dass die *MEF2C*-Expression mit der Expression von *HOXA9* korreliert (<sup>92</sup>Faber *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass *MEF2C* kein direktes Zielgen von MLL und dessen Fusionsproteinen,

sondern von *HOXA9* im MLL-assoziierten Transformationsprozess ist.

## **6.2 Mef2c erhöht die Migrationskapazität von MLL/ENL transformierten Zellen und führt zu einer Vergrößerung der Cxcr4-exprimierenden Subpopulation innerhalb des MLL/ENL-Zellpools**

Besonders die Arbeit von <sup>55</sup>Cozzio *et al.* (2003) unterstützt die Hypothese, dass die Transformation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch MLL/ENL zur Bildung von sogenannten leukämischen Stammzellen (LSZ) führt. Die Hypothese zur Existenz von leukämischen Stammzellen besagt, dass eine geringe Anzahl an malignen Zellen innerhalb eines großen leukämischen Zellpools in der Lage ist, die Leukämien zu induzieren und zu erhalten. Diese Eigenschaft ist vergleichbar mit gesunden hämatopoetischen Stammzellen: ein kleiner Pool an Stammzellen kann sich zum einen immer wieder selbst erneuern und zum anderen das gesamte hämatopoetische System regenerieren. Zur Induktion von leukämischen Stammzellen aus bereits determinierten und differenzierten Blutzellen sind Mutationen notwendig, wodurch die Kapazität zur Selbsterneuerung dieser Zellen zurückgehalten wird und die Kapazität zur Proliferation beziehungsweise (reifungsgestörten) Differenzierung und Ausbreitung der Zellen erhalten bleibt (zusammengefasst in <sup>9</sup>Passegue *et al.*, 2003).

In weiteren Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst getestet, ob Mef2c wichtig für die Übertragung von Stammzeleigenschaften auf die durch die MLL/ENL-Transformation erhaltenen leukämischen Zellen sein könnte. In mehreren *in vitro* Versuchen konnte eine erhöhte Migrationsfähigkeit der M/E-Mef2c-exprimierenden verglichen mit M/E-Mef2c-defizienten, aber auch der M/E-Mef2c-überexprimierenden verglichen mit M/E-Mef2c-wildtyp-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Erste Hinweise dazu lieferten die Cobblestone-Assays, bei denen M/E-Mef2c-überexprimierende, beziehungsweise -wildtyp Zellen auf einer Einzelzellschicht von MS-5-Stromazellen ausplattiert wurden. Die Mef2c-überexprimierenden Zellen zeigten eine erhöhte und beschleunigte Kapazität an die MS-5 Zellen zu binden und diese zu unterwandern, was zur Bildung von Cobblestone-Einheiten unterhalb der MS-5-Zellschicht führte.

Im Folgenden wurden FACS-analytische Untersuchungen zur Expression der Oberflächenrezeptoren CD44 und Cxcr4 auf M/E-Mef2c-exprimierenden verglichen mit Mef2c-defizienten M/E-Zellen vorgenommen. Beide Rezeptoren sind für frühe Knochenmarkzellen von großer Bedeutung, da sie die Bindung und Rückhaltung der HSZ in ihrer Nische bewerkstelligen, aber auch die gerichtete Migration von mobilisierten HSZ in der Peripherie steuern (zusammengefasst in <sup>8</sup>Kucia *et al.*, 2005). Die Analysen ergaben, dass das transmembrane Glycoprotein CD44 unabhängig vom Genotyp stark auf beiden M/E-Zelllinien exprimiert wird. Dies steht in Einklang mit Expressionsanalysen von

Patientenproben, die eine *MLL*-Translokation aufweisen, in denen häufig eine Hochregulation von CD44 nachgewiesen wurde (<sup>43</sup>Armstrong *et al.*, 2002). Die Beobachtung der erhöhten Migrationskapazität von M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen kann dadurch allerdings nicht erklärt werden. Für den G-Protein gekoppelten Rezeptor Cxcr4 wurde dagegen in allen Analysen eine zwar immer kleine, aber reproduzierbar konstante Cxcr4-exprimierende Subpopulation innerhalb der M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen, nicht aber der M/E-Mef2c-defizienten Zellen, gefunden. Dieses Protein, das über sieben transmembrane Domänen in der Zellmembran verankert ist, stellt den einzigen Rezeptor für das Chemokin SDF1 $\alpha$  dar (Zusammenfassung in <sup>8</sup>Kucia *et al.*, 2005) und es ist bekannt, dass SDF1 $\alpha$  von MS-5-Stromazellen exprimiert und ins Medium sezerniert wird (<sup>93</sup>Bleul *et al.*, 1996). Beide Tatsachen legten die Vermutung nahe, dass die erhöhte Migrationskapazität von M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen auf MS-5-Stromazellen durch die Interaktion zwischen Cxcr4 und SDF1 $\alpha$  begründet ist. Durch quantitative *in vitro* Migrationsversuche in Transmigrations-Zellkultur-Platten konnte die erhöhte Migrationsfähigkeit der M/E-Mef2c-exprimierenden verglichen mit Mef2c-defizienten Zellen bestätigt werden. In diesen Versuchen erfolgte die Migration gerichtet einem SDF1 $\alpha$ -Gradienten. Hier ist von Bedeutung, dass dies sowohl mit M/E-Mef2c-wildtyp Zellen verglichen zu M/E-Mef2c-defizienten Zellen, als auch mit vom Genotyp her *Mef2c* defizienten M/E-Zellen, in denen die Expression des Transkriptionsfaktors durch Infektion mit gammaretroviralen Pseudotypen wiederhergestellt wurde, gesehen werden konnte. Dies zeigt, dass es sich um einen Mef2c-vermittelten Effekt handelte.

Da *Mef2c* recht stark in HSZ exprimiert wird (<sup>63</sup>Schüler und Schwieger *et al.*, 2008) und die Expression von Cxcr4 für HSZ von besonderer Bedeutung ist, lieferte diese Beobachtung einen ersten Hinweis auf eine möglicherweise von Mef2c auf M/E-transformierte Knochenmarkzellen übertragene Stammzeleigenschaft und soll im Folgenden in diesem Kontext diskutiert werden. Die zwar immer kleine, aber konstant nachweisbare Cxcr4-positive Subpopulation innerhalb der M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen könnte einen kleinen leukämischen Stammzellpool innerhalb des großen leukämischen Zellpools darstellen. <sup>55</sup>Cozzio *et al.* zeigten durch Verdünnungsreihen in ihren Experimenten mit *MLL/ENL* transformierten HSZ, CMPs und GMPs, dass eine kleine Subpopulation der transformierten Zellen ausreicht, um eine Leukämie in konditionierten Empfängertieren zu induzieren. Diese könnte der von uns detektierten Cxcr4 positiven Population entsprechen. Es ist bereits bekannt, dass LSZ aber auch andere Tumorstammzellen und Blasten von AML-Patienten Cxcr4 exprimieren (<sup>94</sup>Möhle *et al.*, 1998 und Zusammenfassungen von <sup>8</sup>Kucia *et al.*, 2005 und <sup>95</sup>Lapidot *et al.*, 2005). In gesunden HSZ übernimmt Cxcr4 mehrere wichtige Funktionen: während der Embryonalentwicklung müssen diese Zellen zum Beispiel aus der fötalen Leber ins Knochenmark migrieren können um dort in ihrer Nische

anzusiedeln und während des gesamten adulten Lebens die Regeneration des Blutes aufrechterhalten zu können. Weiterhin ist die Migration von HSZ und hämatopoetischen Vorläuferzellen wichtig für eine schnelle Bereitstellung von Blutzellen nach Verletzung oder zur Abwehr körperfremder Stoffe. Alle diese Prozesse erfordern eine aktive Migration und werden unter anderem über die Cxcr4-SDF1 $\alpha$  Interaktion reguliert (zusammengefasst in <sup>8</sup>Kuchia *et al.*, 2005). Von <sup>96</sup>Wright *et al.* wurde 2002 beschrieben, dass HSZ *in vitro* ausschließlich in Richtung eines SDF1 $\alpha$  Gradienten migrieren. Cxcr4 wird nicht nur auf Stammzellen des murinen hämatopoetischen Systems, sondern auch auf humanen CD34+ Vorläuferzellen, sowie anderen Gewebestammzellen exprimiert (zusammengefasst in <sup>8</sup>Kuchia *et al.*, 2005 und <sup>95</sup>Lapidot *et al.*, 2005).

Obwohl die ersten Untersuchungen zur Cxcr4-Expression die Vermutung nahe legten, dass *Cxcr4* ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors Mef2c sein könnte, konnte dies in mehreren Ansätzen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die RT-PCR Analysen mit mRNA aus M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen verglichen mit M/E-Mef2c-defizienten Zellen zeigten keine Unterschiede in der Expression des Cxcr4-Transkripts. Der Vergleich mit der Expressionsstärke des Haushaltsgens *Aktin* ergab jedoch, dass *Cxcr4* in beiden Zelllinien recht stark exprimiert wird. Um eine möglicherweise doch auf transkriptioneller Ebene stattfindende Aktivierung des *Cxcr4*-Gens durch Mef2c nicht zu übersehen, wurde ein Schnittpunkt in der Regulation von Mef2c als Transkriptionsfaktor und des *Cxcr4*-Gens genauer untersucht: Sowohl die Aktivität von Mef2c zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen, als auch die Expression von *Cxcr4* sind teilweise Calcium-abhängig (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000; <sup>85</sup>Moriuchi *et al.*, 1997). Für Mef2-Proteine ist gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität aufgrund einer hemmenden Interaktion mit Histondeacetylasen (HDACs) der Klasse IIa vermindert oder blockiert sein kann (zusammengefasst in <sup>66</sup>Potthoff und Olson, 2007). Äußere Stimuli, die zur Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration führen, bedingen eine nachfolgende Aktivierung von Calcium-abhängigen Kinasen (Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK)), wodurch die HDACs phosphoryliert werden und die Interaktion mit den Mef2-Proteinen aufgehoben wird (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000; <sup>72</sup>McKinsey *et al.*, 2002). Um nun eine unabhängig von äußeren Faktoren und Stimuli hohe Aktivität von Mef2c als Transkriptionsfaktor zu erreichen, wurde für diese Arbeit mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese eine mutante Form von Mef2c hergestellt. Diese ist nicht mehr in der Lage, mit HDACs der Klasse IIa zu interagieren, kann aber trotzdem weiterhin an die Mef2c-Zielsequenzen in der DNA binden und so die Transkription der entsprechenden Zielgene aktivieren. Obwohl die durchgeführte Mutation des *Mef2c*-codierenden Gens nach Vorlage einer bereits publizierten Form von *Mef2c* erfolgte, die nicht mehr in der Lage ist speziell mit HDAC4 zu interagieren (<sup>83</sup>Lu *et al.*, 2000), sollte aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Mef2-Interaktionsmotive der Klasse IIa-HDACs (<sup>27</sup>Haberland *et al.*, 2009) auch keine

Interaktion mit anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie mehr möglich sein.

Nach Infektion von M/E-Mef2c-defizienten Zellen zur Expression der mutierten Form von Mef2c (Mef2c<sup>ASR</sup>), wurden diese vergleichend mit den M/E-Mef2c-defizienten Zellen hinsichtlich der Cxcr4-Expression und des Migrationsverhaltens untersucht. Wie in den Ergebnissen beschrieben konnte eine um das circa 6-fache vergrößerte Population Cxcr4-exprimierender Zellen innerhalb der M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-Population im Vergleich zu den M/E-Mef2c-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Auch die Migrationskapazität dieser Zellen war im Vergleich zu Mef2c-defizienten, aber auch zu den Mef2c<sup>wt</sup>-exprimierenden M/E-Zellen, erhöht. Erstaunlicherweise konnte dies allerdings nicht in Abhängigkeit eines SDF1 $\alpha$  Gradienten beobachtet werden. Die Zugabe von SDF1 $\alpha$  in die untere Kammer der Transmigrations-Zellkultur-Platte führte stattdessen zu einer Hemmung der Migration. Es ist zwar bekannt, dass eine hohe Konzentration an SDF1 $\alpha$  zur Hemmung des Cxcr4-Rezeptors führen kann (Übersicht in <sup>97</sup>Busillo und Benovic, 2007), nicht aber, dass eine starke Expression des Rezeptors zu einer Hemmung der Migration in Richtung eines SDF1 $\alpha$  Gradienten führt. Die beobachtete, ungerichtete verstärkte Migrationsfähigkeit der M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen war reproduzierbar, konnte aber nicht abschließend geklärt werden.

Neben der vergrößerten Cxcr4-positiven Population innerhalb der M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen zeigte die quantitative Analyse der Cxcr4-mRNA-Menge, dass diese ebenfalls um das 1,6-fache erhöht in M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-Zellen verglichen zu M/E-Mef2c <sup>$\Delta$</sup> -Zellen vorlag. Obwohl die leichte Erhöhung der Cxcr4-Expression sowohl auf Proteinebene, als auch auf Transkriptionsebene eine direkte Folge der Mef2c<sup>ASR</sup>-Expression sein könnte, war es schwierig, dies experimentell zu zeigen. Zum direkten Nachweis, dass Cxcr4 ein Zielgen von Mef2c darstellt, muss eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt werden. Für diese Art von Experiment ist allerdings eine sehr hohe Zellzahl notwendig, die selbst nach Sortierung der Cxcr4-positiven Subpopulation nicht gewonnen werden konnte. Grund hierfür war, dass sich nach Weiterkultivierung der sortierten Cxcr4-exprimierenden Zellen immer wieder ein Gleichgewicht zwischen Cxcr4-negativen und Cxcr4-positiven Zellen einstellte.

Da auch in Mef2c-defizienten M/E-Zellen eine recht starke Expression der Cxcr4-mRNA detektiert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die verstärkte Oberflächenexpression von Cxcr4 in Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen auch die Folge einer Regulation auf Proteinebene sein könnte. Die Cxcr4-Expression wird bekanntermaßen auf verschiedenen Ebenen reguliert, wobei vor allem die Interaktion mit weiteren Rezeptoren eine große Rolle für die Expression und Stabilität des Cxcr4-Rezeptors an der Zelloberfläche spielt (Übersicht in <sup>97</sup>Busillo und Benovic, 2007).

Um dies genauer zu untersuchen wurde eine gesamtgenomische

Expressionsanalyse der M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen im Vergleich zu M/E-Mef2c<sup>Δ/-</sup>-Zellen vorgenommen. Ziel hierbei war es, mögliche direkte Zielgene von Mef2c identifizieren zu können, die zum einen mit der Oberflächenexpression von Cxcr4 in Zusammenhang stehen und zum anderen die Migrationsfähigkeit *per se* beeinflussen könnten.

### 6.3 Mef2c beeinflusst die Expression Migrations-assoziiierter Gene

Wie in den Ergebnissen beschrieben, ergab der Vergleich der gesamtgenomischen Genexpression der M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen mit den M/E-Mef2c-defizienten Zellen, dass in ersteren einige Gene der Chemokinrezeptor- und liganden Familie, sowie der Matrix-Metalloproteasen signifikant hochreguliert waren. Diese Faktoren werden im Allgemeinen mit der Fähigkeit von Zellen zur gerichteten Migration (Chemotaxis) in Verbindung gebracht, zum Beispiel bei der Migration von Leukozyten in entzündete Körperbereiche, aber auch bei der Ausbreitung von Tumorzellen (Metastasen; Übersicht in <sup>98</sup>Kulbe *et al.*, 2004).

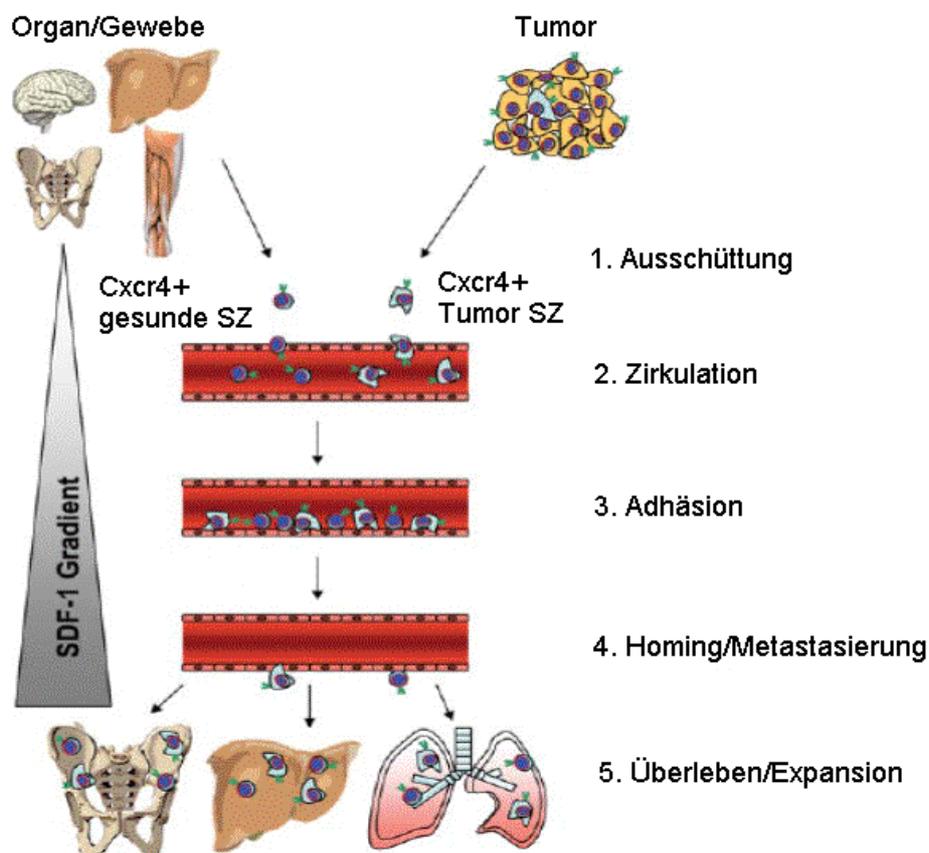
Die in M/E-Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen signifikant hochregulierten Gene codierten für die Chemokinrezeptoren *Ccr2* und *Ccr5*, sowie die Chemokinliganden *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4* und *Ccl6* und die Matrix-Metalloproteasen *Mmp8*, *Mmp12* und *Mmp25*. Im Zusammenhang mit der vergrößerten Cxcr4-positiven Population innerhalb der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen ist hier vor allem die erhöhte *Ccr5*-Expression von Bedeutung. *Ccr5* ist wie Cxcr4 ein Co-Rezeptor für die Infektion von (CD4-positiven) T-Zellen durch HI-Viren. Die Interaktion der beiden Rezeptoren führt zur Stabilisation des Heterodimers als solches, aber auch zur Stabilisierung der Oberflächenexpression der Proteine (<sup>99</sup>Wang *et al.*, 2004; <sup>100</sup>Isik *et al.*, 2008). Die verstärkte Expression von *Ccr5* in Mef2c<sup>ASR</sup>-exprimierenden Zellen konnte durch *real-time* PCR bestätigt werden und es wurde eine zwischen Mensch und Maus hoch konservierte Mef2-Bindungssequenz im 5'-Bereich des *Ccr5* Gens gefunden. Diese Tatsachen sprechen dafür, dass *Ccr5* ein direktes Zielgen von Mef2c darstellt, sowie dass die verstärkte Expression von *Ccr5* eine Ursache für die vergrößerte Cxcr4-positive Population innerhalb der M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen sein könnte.

Das gesamte Genexpressionsprofil der Mef2c-exprimierenden im Vergleich zu den Mef2c-defizienten M/E-Zellen kann sehr gut in Zusammenhang mit den *in vivo* erzielten Ergebnissen gebracht werden. Die mit Hilfe des *in vivo* Migrationsassays detektierte verminderte Homingkapazität von Mef2c-defizienten Knochenmarkzellen (nicht mit MLL/ENL transformiert) kann durch eine eventuell verminderte *Ccr5* und damit verminderte Cxcr4-Oberflächenexpression Mef2c-defizienter Zellen erklärt werden. Durch die Bestrahlung der Tiere vor Transplantation der Mef2c-wildtyp beziehungsweise -defizienten Knochenmarkzellen sollte die Expression und Sezernierung von SDF1α innerhalb bestimmter Organe wie Knochenmark und Milz induziert werden. Dies ist neben weiteren

Konditionierungsmethoden eine gängige Methode, die auch vor der Stammzell-beziehungswise Knochenmarktransplantation bei Menschen angewendet wird. Die Ganzkörperbestrahlung induziert die SDF1 $\alpha$  Produktion, so dass in dem Transplantat enthaltene Cxcr4-positive Stammzellen in ihre Nischen migrieren und dort anwachsen können (<sup>95</sup>Übersicht in Lapidot *et al.*, 2005). Sowohl in den Milzen als auch im Knochenmark der *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Knochenmark-Empfängertiere konnte vier Stunden nach Transplantation der Zellen eine größere Anzahl dieser wiedergefunden werden als in den *Mef2c* <sup>$\Delta$ /-</sup>-Knochenmark-Empfängertieren. Da die Interaktion des Cxcr4 Rezeptors mit dem Liganden SDF1 $\alpha$  während des Homings zu einer Internalisierung dieses Rezeptor/Liganden-Komplexes führt (<sup>101</sup>Cheng *et al.*, 2000), wurde kein Unterschied mehr in der Cxcr4-Oberflächenexpression zwischen den *Mef2c*<sup>+/+</sup> und *Mef2c* <sup>$\Delta$ /-</sup> Zellen erwartet und dementsprechend keine FACS-analytische Untersuchung auf Cxcr4-Expression durchgeführt.

In den Langzeit-Transplantationsversuchen mit MLL/ENL-*Mef2c* <sup>$\Delta$ /-</sup> und MLL/ENL-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Knochenmarkzellen konnte eine etwas verzögerte Latenzzeit der durch MLL/ENL-*Mef2c* <sup>$\Delta$ /-</sup> Knochenmarkzellen induzierten akuten myeloischen Leukämien nachgewiesen werden (mittlere Überlebenszeit 75 Tage verglichen mit 52 Tagen der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere). Durch eine zweite Versuchsreihe, in der *Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise *Mef2c* <sup>$\Delta$ /-</sup>-Knochenmarkzellen transplantiert wurden, die durchschnittlich zu 5% mit MLL/ENL infiziert waren, konnten alle Empfängertiere innerhalb eines ähnlichen Zeitraumes (50 bis 54 Tage nach Transplantation) vor Ausbruch der Krankheit auf das Fortschreiten der Verteilung der leukämischen Zellen untersucht werden. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede: Während in beiden Empfängerkohorten das Knochenmark bereits zu ca. 80% aus den (GFP-positiven) M/E-transformierten leukämischen Zellen bestand, konnten diese Zellen in den peripheren hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Organen in unterschiedlichem Ausmaß gefunden werden, was auf ein unterschiedlich schnelles Erreichen dieser Organe möglicherweise aufgrund der unterschiedlich starken Cxcr4-Expression hindeutet. Im Fall der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere konnte eine signifikant höhere eGFP-Expression in den Milzen, sowie eine stärkere Vergrößerung dieses Organs nachgewiesen werden, was auf eine bereits starke Durchsetzung der Milzen durch leukämische M/E-Zellen hindeutet. Die gleichen Beobachtungen trafen für das periphere Blut zu – signifikant höhere Anzahl an Leukozyten und blastenreiche Blutaussstriche im Fall der M/E *Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertiere – sowie für die Leber als Beispiel für die verstärkte Invasion der M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Zellen auch in nicht-hämatopoetische Organe. Auch wenn das beschleunigte Erreichen der peripheren Organe durch *Mef2c*-exprimierende M/E-Zellen die vergrößerte Cxcr4-Population dieser Zellen als Ursache nahe legt, konnte dies abschließend nicht geklärt werden. Es wurden – wie aufgrund der oben erwähnten bekannten Internalisierung des Cxcr4-Rezeptors nach Interaktion mit SDF1 $\alpha$  erwartet – keine Unterschiede in der Cxcr4-Expression der

GFP-positiven (M/E-transformierten) Zellen innerhalb der untersuchten Organe nachgewiesen. Für humane AML wird die Expression des CXCR4-Rezeptors auf leukämischen Knochenmarkszellen als prognostischer Marker, der einen negativen und schnellen Verlauf, sowie eine hohe Rückfallquote der Krankheit voraussagt, vorgeschlagen (<sup>102</sup>Spoo *et al.*, 2006). Die CXCR4-Expression auf malignen Zellen hat letztlich die gleiche Funktion wie auf gesunden Zellen: die Migration sehr früher Stamm- beziehungsweise Vorläuferzellen entlang eines SDF1 $\alpha$  Gradienten durch den Organismus, wodurch es zur Ausbreitung maligner (Stamm-)Zellen kommen kann. Dies ist in der aus <sup>8</sup>Kucia *et al.* (2005) übernommenen Abbildung 26 schematisch dargestellt.



**Abbildung 26: Vergleich der Cxcr4-assoziierten Migration gesunder und maligner Stammzellen.**; Eine Erhöhung der SDF1 $\alpha$  Konzentration innerhalb eines Organismus kann zur Ausschüttung Cxcr4-positiver gesunder oder maligner Stammzellen aus ihren Nischen in die Blutzirkulation führen. Im Bereich der Organe mit hoher SDF1 $\alpha$  Konzentration migrieren die Cxcr4-positiven Zellen über das Endothel der Blutkapillaren in die entsprechenden Bereiche und bewirken auf diese Weise sowohl Homing, als auch Metastasierung. Übernommen und modifiziert aus <sup>8</sup>Kucia *et al.*, 2005.

Die in den M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>-Empfängertieren detektierte verstärkte Durchsetzung der Organe durch leukämische M/E-*Mef2c*<sup>+/+</sup>Zellen kann gut durch die in der gesamtgenomischen Expressionsanalyse gefundene erhöhte Expression der Matrix-

Metalloproteasen erklärt werden. Bei den Matrix-Metalloproteasen handelt es sich um eine Familie von Endopeptidasen, die Zink- und Calcium-abhängig Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen können und aufgrund dessen klassischerweise mit Zellbewegung in Zusammenhang gebracht werden. Anhand ihrer Substrate können Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Elastasen und wenige andere unterschieden werden. Die meisten der Mmp-Proteine werden als inaktive Vorstufen in ihre Umgebung sezerniert und dort durch weitere Enzyme geschnitten und aktiviert. Neben den sezernierten Mmp-Proteinen gibt es auch einige membranständige Mmp-Proteine (Übersicht in <sup>103</sup>Somerville *et al.*, 2003). Die Metastasierung von soliden Tumorzellen, sowie die Prognose für das Fortschreiten solider Tumoren wird bereits sehr lange in Verbindung mit einer verstärkten Expression von Mmp 2 und 9 gebracht (zur Übersicht <sup>104</sup>Stefanidakis und Koivunen, 2006). Diese Mmp-Proteine gehören zu den Gelatinasen und sind wichtig für den ersten Schritt der Invasion von Tumorzellen in fremdes Gewebe, welcher den Abbau der Basalmembran darstellt. Obwohl diese beiden Mmp-Gene nicht als hochreguliert innerhalb der Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen gefunden werden konnten, wurde eine starke Expression von Mmp 9 in beiden M/E-Zelllinien detektiert. Interessanterweise sind die Mmp-Proteine 8 und 25, deren Gene in Mef2c-exprimierenden M/E-Zellen hochreguliert waren, wichtig für die Regulation der Mmp 2 und Mmp 9 Aktivität: Während Mmp 25 die inaktive Vorstufe von Mmp 2 – pro-Mmp 2 – durch schneiden aktivieren kann, ist Mmp 8 wichtig für den Abbau der tripelhelikalen Domäne von Kollagenfibrillen (Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix), wodurch diese Moleküle instabil werden und zu Gelatin hydrolysiert werden können. Gelatin ist wiederum das Substrat für Mmp 2 und 9 (Übersicht in <sup>105</sup>Stefanidakis und Koivunen, 2006). Für Mmp 8 konnte eine zwischen Mensch und Maus konservierte Mef2-Bindungssequenz im 5'Bereich gefunden werden.

Auch das Chemokin Ccl6, dessen Gen in M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen als hochreguliert gefunden wurde, konnte bereits früher mit verstärkter Tumorigenität und Metastasierungsfähigkeit von L-Myc assoziierten Tumorzellen in Verbindung gebracht werden (<sup>106</sup>Yi *et al.*, 2003).

Mit Hilfe dieser Ergebnisse lässt sich somit zeigen, dass Mef2c (1) zwar keinen Einfluss auf die durch MLL/ENL induzierte Transformation früher muriner Knochenmarkzellen hat, aber (2) mit erhöhter Homing- und Migrationskapazität *in vitro* und *in vivo* eine wichtige Stammzeleigenschaft auf die transformierten leukämischen M/E-Zellen überträgt. Die erhöhte Migrationskapazität in Verbindung mit der verstärkten Expression von Matrix-Metalloproteasen kann eventuell durch das ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesene Differenzierungspotenzial des Transkriptionsfaktors Mef2c erklärt werden, welches im Folgenden diskutiert wird.

#### 6.4 Mef2c induziert die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen aus granulozytären/monozytären Vorläuferzellen

Die Überexpression von Mef2c in dem in unserem Labor etablierten C57Bl/6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mausmodell induzierte nach kurzer Latenzzeit eine aggressive AML, die vor allem durch eine hohe Anzahl an unreifen Blasten und monozytären Vorläuferzellen im Knochenmark und Blut charakterisiert war (M. Schwieger, C. Stocking, nicht publiziert). *In vitro* Methylzellulose-Assays mit B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Mef2c Knochenmarkzellen zeigten weiterhin eine fast exklusive Entwicklung von Makrophagen (<sup>63</sup>Schüler und Schwieger *et al.*, 2008). Da im Gegensatz zu diesen Beobachtungen für das B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Mausmodell eine Erhöhung der Granulozyten auf Kosten von Monozyten/Makrophagen beschrieben ist (<sup>62</sup>Holtschke *et al.*, 1996; <sup>64</sup>Scheller *et al.*, 1999), war die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vorliegende verstärkte Monopoese nach Mef2c-Überexpression in B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen unerwartet und lieferte den ersten Hinweis auf ein mögliches Differenzierungspotenzial dieses Transkriptionsfaktors.

Um dies zu untersuchen wurden zunächst Methylzellulose-Assays mit C57Bl/6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> und *-Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Knochenmarkzellen durchgeführt. Die Differenzierung früher Knochenmarkzellen wird intrazellulär vor allem durch die Aktivität und Konzentration von Transkriptionsfaktoren gesteuert (Übersicht in <sup>10</sup>Laiosa *et al.*, 2006; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Eine wichtige Rolle spielen aber auch extrazelluläre Faktoren und Stimuli, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen und so die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren modulieren und auf diese Art und Weise zur Proliferation und zum Überleben entsprechender Blutzelllinien beitragen (<sup>107</sup>Kondo *et al.*, 2000; <sup>108</sup>Dahl *et al.*, 2003). Vor allem bei der Entwicklung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen als Folge einer Immunantwort in entsprechenden Situationen, sind äußere Faktoren wie Interleukine und Zytokine von Bedeutung. Diese werden in der Regel von Blutzellen, die bereits an der Immunabwehr beteiligt sind, sezerniert und über den Blutkreislauf transportiert, so dass aus entsprechenden Vorläuferzellen im Knochenmark und peripheren Blut weitere Blutzellen zur Immunabwehr bereit gestellt werden können (Übersicht in <sup>30</sup>Nathan, 2002; <sup>109</sup>Pollard, 2004). Aufgrund dieser Tatsachen, sowie der *in vitro* in Methylzellulose-Assays beobachteten exklusiven Entwicklung der B6-*Icsbp*<sup>-/-</sup>-Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen in Makrophagen wurden die in Methylzellulose ausplattierten B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> beziehungsweise *-Mef2c*<sup>Δ/-</sup> Knochenmarkzellen mit M-CSF supplementiert. Wie in den Ergebnissen beschrieben, konnte in diesen Versuchen eine Entwicklung der B6-*Mef2c*<sup>+/+</sup> Knochenmarkzellen in überwiegend Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden. Dagegen entwickelten sich innerhalb der B6-*Mef2c*<sup>Δ/-</sup>-Knochenmarkzellkulturen trotz Stimulaton mit M-CSF deutlich weniger Monozyten/Makrophagen und stattdessen ein größerer Anteil an reifen Granulozyten. Diese Beobachtungen wurden unterstützt durch

einen weiteren Ansatz, in dem C57Bl/6-Knochenmarkzellen zur Überexpression von *Mef2c*, beziehungsweise *eGFP* manipuliert wurden. In dieser Versuchsreihe sollte getestet werden, ob unterschiedliche Zytokine einen Einfluss auf die verminderte Granulopoese beziehungsweise verstärkte Monopoese/Makrophagenentwicklung in *Mef2c*- (über)exprimierenden Zellen haben. Auch in diesen Ansätzen wurde eine verstärkte Entwicklung der *Mef2c*-überexprimierenden B6-Knochenmarkzellen in Monozyten/Makrophagen auf Kosten von Granulozyten beobachtet. Dieser Effekt war besonders deutlich in den Methylzellulose-Kulturen, die mit G-CSF supplementiert waren. Obwohl in diesem Ansatz die granulozytäre Entwicklung durch G-CSF unterstützt wird, exprimierten deutlich weniger *Mef2c*-überexprimierende B6-Knochenmarkzellen das granulozytäre Oberflächenprotein Gr-1, verglichen zu den *eGFP*-B6-Kontrollzellen. Auch in den Methylzellulose-Ansätzen mit M-CSF exprimierten die *Mef2c*-überexprimierenden B6-Zellen signifikant weniger Gr-1 verglichen zu den *eGFP*-Kontrollkulturen; durch dieses Zytokin wird die monozytäre/makrophagiale Entwicklung verstärkt, was mit einer Herunterregulation von Gr-1 einhergeht (<sup>110</sup>Hestdal *et al.*, 1991).

Aufgrund dieser ersten Beobachtungen in Bezug auf die Differenzierungseigenschaft von *Mef2c*- (über)exprimierenden B6-Knochenmarkzellen konnte vermutet werden, dass *Mef2c* als sekundäre Determinante – nach Stimulation der Zellen mit myeloiden Zytokinen – die monozytäre/makrophagiale Entwicklung beeinflusst. Besonders die starke Entwicklung von Makrophagen *in vitro* nach Stimulation der Zellen mit M-CSF und die verminderte Entwicklung von Granulozyten trotz G-CSF Stimulation scheint mit der Aktivität von *Mef2c* als wichtigem Transkriptionsfaktor für die Monopoese in Einklang zu stehen: während G-CSF die Entwicklung von *Mef2c*-überexprimierenden Knochenmarkzellen nicht in Richtung Granulopoese beeinflussen kann, scheint M-CSF *Mef2c*-involvierende Signalwege zu aktivieren, die zum einen die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen aus GMPs und zum anderen die weitere Entwicklung von Makrophagen aus Monozyten fördern.

Weiterhin erscheint die verstärkte Makrophagenentwicklung von *Mef2c*-exprimierenden Knochenmarkzellen in Einklang mit der erhöhten Migrationskapazität von *Mef2c*-exprimierenden M/E-Zellen wie im ersten Abschnitt beschrieben, zu stehen. Makrophagen stellen eine wichtige Zellpopulation im Zusammenhang mit der Immunabwehr innerhalb fast aller Gewebe eines Organismus dar. Dementsprechend müssen diese Zellen in der Lage sein, sich innerhalb der Gewebe bewegen zu können, was unter anderem aufgrund der Expression und Sezernierung von Matrix-Metalloproteasen möglich ist. Dies spielt wiederum auch eine Rolle für eine verstärkte Metastasierung von Tumorzellen mit Hilfe von Tumor-assoziierten Makrophagen (Übersicht in <sup>109</sup>Pollard, 2004). Auch wenn die Expression von Matrix-Metalloproteasen nicht zur Entwicklung von Makrophagen beiträgt, so erscheint es für diese Arbeit trotzdem von Bedeutung, dass einige dieser Proteine eventuell

direkte Zielgene von Mef2c sein könnten. Für die in M/E-Mef2c-exprimierenden Zellen hochregulierten *Mmp's 8* und *12* konnten innerhalb der regulatorischen Sequenzen dieser Gene konservierte Mef2-Bindungssequenzen gefunden werden. Ob diese Gene auch im Kontext nicht transformierter, Mef2c-exprimierender Knochenmarkzellen hochreguliert sind, wurde in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht getestet und kann dementsprechend nur vermutet werden.

### 6.5 Mef2c induziert das für die monozytäre Entwicklung wichtige Gen c-jun

Um den möglichen Mechanismus zur verstärkten Entwicklung der Mef2c-exprimierenden Knochenmarkzellen in Monozyten/Makrophagen auf Kosten von Granulozyten identifizieren zu können, wurden weitere Versuche mit den von uns etablierten MLL/ENL transformierten myeloiden Knochenmarkzelllinien und einer weiteren myeloiden Zelllinie – FDCP-1 – durchgeführt. Ein Hauptmerk lag dabei auf der Untersuchung der Transkript- und Proteinlevel von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität bereits in vielen Studien in Zusammenhang mit der Differenzierung von GMPs gebracht wurde. Zwei der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Entscheidung zwischen monozytärer und granulozytärer Entwicklung von GMPs sind der zur Familie der Ets-Proteine gehörende Faktor Pu.1 und das basische Leuzin-Zipper Protein C/ebp $\alpha$  (zusammengefasst in <sup>10</sup>Laiosa *et al.*, 2006; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Auch die Faktoren der fos- und jun-Proteinfamilie, die gemeinsam den Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 bilden, sind wichtige Transkriptionsfaktoren für die myeloide Differenzierung. Hier spielt vor allem die Expression des basischen Leuzin-Zipper Proteins c-jun eine Rolle (<sup>111</sup>Lord *et al.*, 1993; <sup>112</sup>Gaynor *et al.*, 1991).

In einem ersten Ansatz wurden zunächst die Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren Pu.1, C/ebp $\alpha$  und c-jun in Milzzellen aus Mäusen, die mit M/E-Mef2c<sup>+/+</sup> beziehungsweise -Mef2c<sup>-/-</sup> Zellen transplantiert waren, untersucht. Dieser Versuchsaufbau diente der Möglichkeit, endogene, Mef2c-induzierte Transkriptionsfaktoren ohne die *in vitro* Zugabe weiterer äußerer Stimuli, identifizieren zu können. Die Untersuchung ergab eine deutlich verminderte Menge des c-jun-Transkriptes in M/E-Mef2c<sup>-/-</sup>-Zellen, während die Pu.1 und C/ebp $\alpha$  Expression nicht signifikant verändert war. Um dies zu verifizieren und gleichzeitig zu zeigen, dass es sich dabei tatsächlich um einen Mef2c-vermittelten Effekt handelt, wurde die M/E-transformierte Knochenmarkzelllinie (Mef2c-Wildtyp-Genotyp) zur Überexpression von Mef2c, beziehungsweise eGFP als Kontrolle, manipuliert. Nach Kultur dieser Zellen in Expansionsmedium, das die Proliferation myeloider Zellen unterstützt, aber keine Differenzierung induziert, erfolgte eine Untersuchung der Proteinlysate. In Mef2c-überexprimierenden M/E-Zellen konnte im Vergleich zu M/E-eGFP exprimierenden Zellen eine signifikant höhere Expression von c-jun nachgewiesen werden.

Für die Expression von Pu.1 ergab sich kein Unterschied, während auf Proteinebene die Menge an C/ebp $\alpha$  in M/E-Mef2c-überexprimierenden Zellen vermindert war. Dies konnte in mehreren unabhängigen Untersuchungen der C/ebp $\alpha$  Transkriptmenge nicht verifiziert werden, was auf eine Regulation von C/ebp $\alpha$  auf Proteinebene schließen lässt.

Die hier erzielten Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von Mef2c im Zusammenspiel mit den untersuchten Transkriptionsfaktoren hin. Im Hinblick auf die Pu.1 und C/ebp $\alpha$  Expression ist vor allem von Bedeutung, dass die Konzentrationen dieser beiden Transkriptionsfaktoren während der Schicksalsentscheidung von GMPs eine große Rolle spielt. Während die Expression von Pu.1 als sogenanntes Standard-Programm (*default-pathway*) die Differenzierung von GMPs in Monozyten/Makrophagen aktiviert, führt eine Erhöhung der Konzentration von C/ebp $\alpha$  zur Induktion der granulozytären Entwicklung durch Hemmung des Pu.1 Proteins (<sup>113</sup>Reddy *et al.*, 2002; <sup>108</sup>Dahl *et al.*, 2003). Entsprechend dieser hier vereinfacht dargestellten Funktionen der beiden Transkriptionsfaktoren, bewirkt das Ausschalten des *Pu.1* Gens in hämatopoetischen Zellen unter anderem einen Verlust der Makrophagenentwicklung, während das Ausschalten des *C/ebp $\alpha$*  Gens neben weiteren Defekten zum Verlust der granulozytären Reifung führt (Übersicht in <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Im Zusammenhang mit den hier erzielten Ergebnissen bezüglich der Expression dieser beiden Faktoren auf Proteinebene ist von großer Bedeutung, dass die Pu.1-Level durch die Mef2c-Überexpression nicht beeinflusst werden, während die Konzentration von C/ebp $\alpha$  vermindert ist. So kann die im Verhältnis zur C/ebp $\alpha$  Konzentration erhöhte Pu.1 Konzentration zur Induktion der monozytären/makrophagialen Differenzierung führen. Sehr wichtig ist vor allem die detektierte verstärkte Expression von c-jun in Mef2c-exprimierenden Zellen. C-jun kann gemeinsam mit Pu.1 die Expression des *M-CSF-Rezeptor*-Gens (monozytär exprimiert) und/oder des *Makrosialin-Rezeptor*-Gens (makrophagial exprimiert) aktivieren, welche für die monozytäre/makrophagiale Entwicklung eine wichtige Rolle spielen (<sup>114</sup>Behre *et al.*, 1999; <sup>115</sup>Li *et al.*, 1998). Weiterhin ist bekannt, dass die Überexpression von c-jun zu einer hemmenden Interaktion mit C/ebp $\alpha$  führt, wodurch die granulozytäre Entwicklung gestört wird (<sup>24</sup>Rangatia *et al.*, 2002). Etwas gegensätzlich dazu wird postuliert, dass die Interaktion zwischen zytokinaktiviertem c-jun im AP1-Komplex mit C/ebp $\alpha$  die Pu.1-medierte Monozyten/Makrophagen-Entwicklung aktivieren kann (<sup>116</sup>Wang *et al.*, 2006). Ob die Interaktion zwischen c-jun und C/ebp $\alpha$  in irgendeiner Form zur verminderten Halbwertszeit des C/ebp $\alpha$  Proteins führt und somit der Grund für die in den Westernblot-Analysen detektierte verminderte Menge an C/ebp $\alpha$  ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Zusammenfassend scheint die monozytäre/makrophagiale Differenzierung Mef2c-exprimierender Zellen in Zusammenhang mit der c-jun Aktivität zu stehen und durch äußere Faktoren/Stimuli beeinflusst werden zu können. Diese Beobachtungen werden durch

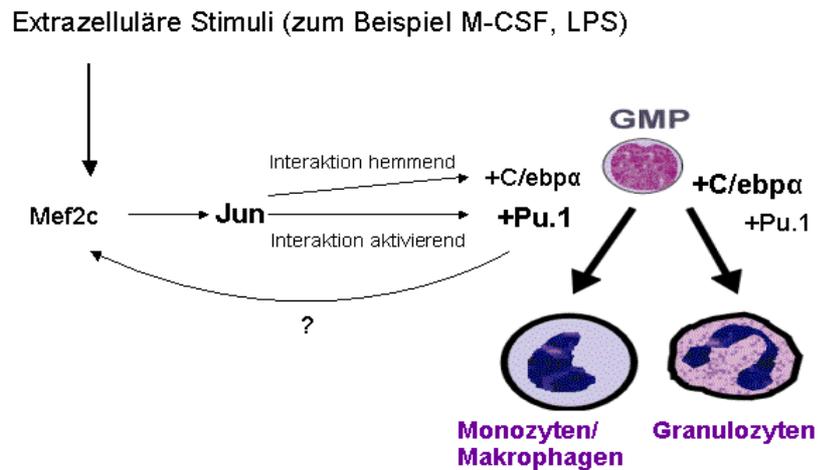
mehrere Studien gestützt. So wird zum Beispiel postuliert, dass c-jun ein wichtiges Zielgen von Mef2-Proteinen, auch in anderen zellulären Kontexten, darstellt (<sup>74</sup>Han *et al.*, 1997; <sup>117</sup>Kato *et al.*, 1997; <sup>118</sup>Wei *et al.*, 2003). Als Folge der Hochregulation von c-jun wäre eine Hochregulation des *M-CSF-Rezeptor*-Gens aufgrund der aktivierenden Kooperation von c-jun mit Pu.1 auf dessen Promotor naheliegend (<sup>114</sup>Behre *et al.*, 1999). Dies könnte in einer positiven Rückkopplung wiederum die weitere Differenzierung von GMPs in Monozyten/Makrophagen über Mef2c-involvierende Signalwege beeinflussen. Dass für Mef2c-exprimierende Zellen allerdings nicht nur die Stimulation des M-CSF-Rezeptors eine Rolle für die Aktivierung Mef2c-assoziiierter Signalwege spielt, konnte durch einen weiteren Versuchsansatz mit der myeloiden Zelllinie FDCP-1 gezeigt werden. Nach Überexpression von *Mef2c* in diesen Zellen und Stimulation mit dem in der Zellwand von gram-negativen Bakterien vorkommenden Lipopolysaccharid (LPS) kam es ebenfalls zur Hochregulation von c-jun sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene. Dieser experimentelle Aufbau legt die mögliche Beteiligung von Mef2c zur schnellen Immunantwort nach zum Beispiel bakterieller Infektion nahe und kann somit auch wieder die starke Entwicklung von Makrophagen in Mef2c-(über)exprimierenden Knochenmarkzellen erklären. Ein ähnliches Experiment wurde bereits 1997 von <sup>74</sup>Han *et al* durchgeführt, wobei in dieser Studie bereits monozytär differenzierte RAW264.7 Zellen verwendet wurden. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Experimente bestätigt werden und es konnte zudem gezeigt werden, dass auch in früheren myeloiden Zellen eine Aktivierung von Mef2c durch LPS zur Hochregulation von c-jun führt. Als zugrunde liegenden Mechanismus postulieren Han *et al.* die LPS-induzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Phosphorylierungs-Kinase (MAPK) p38 und anschließende Phosphorylierung von Mef2c an den Aminosäuren Threonin 293 und 300, sowie des Serins 387 innerhalb der Transaktivierungsdomäne. Die so modifizierte Form von Mef2c ist fähig in den Zellkern zu translozieren und dort die Transkription von *c-jun* zu aktivieren. Neben LPS beziehungsweise der p38-Signalkaskade kann auch die MAPK ERK5 zu einer Aktivierung/Phosphorylierung von Mef2c und anschließender Hochregulation von c-jun führen (<sup>117</sup>Kato *et al.*, 1997).

## **6.6 Die nach Mef2c-Expression erhöhte c-jun Expression trägt zur verminderten Granulopoese bei**

Mit Hilfe der bisher beschriebenen Experimente und Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass (1) Mef2c zu einer verstärkten Monopoese auf Kosten der Granulopoese in frühen Knochenmarkzellen führt und, dass dies (2) wahrscheinlich durch die Hochregulation des bZIP Transkriptionsfaktors c-jun erfolgt. Um dies zu überprüfen, wurden erneut M-CSF-supplementierte Methylzellulose-Assays mit c-jun überexprimierenden C57Bl/6-Knochenmarkzellen durchgeführt. Diese entwickelten sich innerhalb von sieben Tagen

exklusiv in Makrophagen. Im Gegensatz zu den Kontrollkulturen konnte fast keine Expression des granulozytären Oberflächenproteins Gr-1 und keine ausgereiften Granulozyten nachgewiesen werden. Diese sogar noch etwas stärkere Entwicklung der c-jun-überexprimierenden Knochenmarkzellen als der Mef2c-überexprimierenden Knochenmarkzellen in Makrophagen spiegelte die wichtige Funktion von c-jun in der Monopoese/Makrophagenentwicklung wider. Weitere Methylzellulose-Assays bestätigten die Vermutung, dass die monozytäre/makrophagiale Differenzierung von Knochenmarkzellen auf Kosten der Granulopoese zumindest teilweise über Mef2c und c-jun gesteuert wird: durch gleichzeitige Überexpression von Mef2c und Herunterregulation von c-jun konnte ein Teil der Granulopoese dieser Zellen wiederhergestellt werden.

Der hier beschriebene Signalweg zur Induktion der Makrophagenentwicklung über Mef2c und c-jun kann als ein möglicher induzierender Weg angesehen werden, der vor allem durch äußere Faktoren wie Zytokinen und Endotoxinen aktiviert wird. Auch die Aktivität und Menge von Transkriptionsfaktoren *per se* – ohne Einfluss äußerer Faktoren – spielen eine große Rolle für die Entwicklung von Monozyten und Makrophagen aus GMPs. Vor allem ein möglicher Zusammenhang zwischen Pu.1 und c-jun muss hier berücksichtigt werden, allerdings scheint c-jun kein direktes Zielgen von Pu.1 zu sein (<sup>105</sup>Steidl *et al.*, 2006). Dementsprechend könnte Mef2c als mögliches Glied zwischen diesen beiden Faktoren eine Rolle spielen, was zu neueren Studien, in denen *Mef2c* als Zielgen von Pu.1 in der lymphoiden Entwicklung postuliert wird, passt (<sup>119</sup>Stehling-Sun *et al.*, 2009). Eine auf unseren Ergebnissen basierende mögliche Interaktion wichtiger Transkriptionsfaktoren für die Weiterentwicklung von GMPs in Monozyten/Makrophagen oder Granulozyten ist in Abbildung 27 schematisch dargestellt.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der möglichen Interaktion wichtiger Transkriptionsfaktoren während der myeloiden Differenzierung.** Die Stimulation früher myeloider Knochenmarkszellen (GMPs) mit Wachstumsfaktoren oder Endotoxinen kann zur Aktivierung von Mef2c führen. Dies hat eine Hochregulation von c-jun zur Folge. Die möglicherweise hemmende Interaktion zwischen c-jun und C/ebpα und die aktivierende Interaktion zwischen c-jun und Pu.1 kann zur verstärkten Expression monozytärer/makrophagialer Gene führen, was eine erhöhte monozytäre/makrophagiale Entwicklung und Proliferation auf Kosten der Granulopoese hat. Zusätzlich könnte Mef2c ein direktes Zielgen von Pu.1 während der Monopoese darstellen, wodurch es zu einer positiven Rückkopplung kommen kann.

## 6.7 Mef2c als Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese

In der vorliegenden Arbeit konnten bisher unbekannt Funktionen des MADS-box Transkriptionsfaktors Mef2c während der Hämatopoese/Leukämogenese identifiziert werden. Vor allem die Hypothese, dass Mef2c Einfluss auf das Migrationsverhalten von hämatopoetischen Zellen hat, konnte durch neuere Studien in unserem Labor unterstützt und erweitert werden: Mef2c-defiziente hämatopoetische Stammzellen – charakterisiert durch fehlende Expression von Linien-spezifischen Oberflächenrezeptoren, dafür aber Expression der stammzellassozierten Rezeptoren c-Kit und Sca (LSK-Zellen) – zeigen eine verminderte Kapazität das Knochenmark von konditionierten Empfängertieren zu kolonialisieren (Homing) (A. Engelmann, M. Schwieger und C. Stocking, nicht publiziert).

Innerhalb des letzten Jahres wurden einige Studien publiziert, die eine wichtige Rolle für Mef2c in der B-Zellentwicklung postulieren. So zeigen <sup>120</sup>Wilker *et al.* und <sup>121</sup>Khiem *et al.* (beide 2008), dass Mef2c wichtig für die durch den B-Zell-Rezeptor vermittelte Proliferation und Reifung von B-Zellen ist. Neue Studien der Gruppe um Fernando Carmargo postulieren, dass Mef2c ein Schaltergen für die sehr frühe Determination von Knochenmarkszellen in die gesamten lymphoiden Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLP) sei (<sup>119</sup>Stehling-Sun *et al.*, 2009). Auch neuere von unserem Labor erzielte

Ergebnisse sprechen für eine Rolle von Mef2c in der sehr frühen B-Zellentwicklung, hier scheint allerdings die Expression der Mef2c<sup>ASR</sup>-Mutante in frühen Knochenmarkstammzellen von besonderer Bedeutung zu sein. Die Überexpression der Wildtyp-Form von Mef2c hat dagegen weniger Einfluss auf die B-Zellentwicklung, während diese Form in den Studien von Stehling-Sun untersucht wurde und dementsprechend als Schalter angesehen wird. Speziell in diesem Zusammenhang soll *Mef2c* ein direktes Zielgen von Pu.1 darstellen. Pu.1 ist bekanntermaßen auch ein wichtiger Regulator für die frühe Entscheidung zur Entwicklung von CLPs aus multipotenten Vorläuferzellen und spielt in späteren Entwicklungsstadien wieder eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen aus GMPs (Übersicht in <sup>10</sup>Laiosa *et al.*, 2006; <sup>14</sup>Rosenbauer und Tenen, 2007). Somit erscheint eine Regulation von *Mef2c* durch Pu.1 möglich und kann durch unsere Versuche nicht beurteilt werden. In eindeutigem Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen allerdings die Ergebnisse der Gruppe um Camargo bezüglich des myeloiden Differenzierungspotenzials von Mef2c. Während von <sup>119</sup>Stehling-Sun *et al.* postuliert wird, dass Mef2c die myeloide Differenzierung hemmt, können wir eindeutig zeigen, dass durch Expression von Mef2c vor allem Monozyten und Makrophagen aus myeloiden Vorläuferzellen entwickelt werden. Dies wird durch äußere Stimuli (vor allem M-CSF) positiv beeinflusst. Der experimentelle Versuchsaufbau dieser Gruppe kann genau diese Einflüsse nicht zeigen: es werden Mef2c-defiziente myeloide Vorläuferzellen mit einem Fusionsprotein manipuliert, das aus dem Herpes-Simplex-Virus-Protein VP16 fusioniert mit der N-terminalen DNA-Binde- und Homo/Heterodimerisierungsdomäne von Mef2c besteht. Das Aktivatorprotein VP16 kann in diesem Konstrukt zwar die Transkriptionsaktivität von Mef2c auf Promotoren von potenziellen Zielgenen erhöhen, aber keinesfalls kann die Aktivität von Mef2c durch äußere Faktoren beeinflusst werden, da die Transaktivierungsdomänen des Proteins nicht von diesem Konstrukt codiert werden. Gerade die extrazelluläre Stimulation von hämatopoetischen Zellen, neben der Expressionslevel vieler verschiedener Transkriptionsfaktoren, ist allerdings entscheidend für solche Reifungsprozesse.

Zusammenfassend konnte anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gezeigt werden, dass (1) Mef2c eine wichtige Funktion in der Übertragung einer Stammzeleigenschaft auf leukämische, MLL/ENL-transformierte Knochenmark(stamm)zellen ausübt. Dies äußert sich in Form erhöhter Homing- und Migrationskapazität leukämischer M/E-Zellen und somit erhöhter Aggressivität dieser Zellen *in vivo*. In Zusammenhang damit kann (2) das beobachtete Differenzierungspotenzial von Mef2c in gesunden frühen Knochenmarkzellen gebracht werden. Erhöhte Mef2c-Expression führt zur Entwicklung von Monozyten/Makrophagen, welche wichtige migrationsfähige Zellen des Abwehrsystems darstellen. Die Mef2c Aktivität kann (3) durch äußere Faktoren wie M-CSF und LPS

moduliert werden, wodurch eine schnelle Anpassung der hämatopoetischen Zellen an sich verändernde äußere Umstände erfolgen kann.

Vor allem innerhalb der letzten beiden Jahre wurde Mef2c immer häufiger als neuer wichtiger Transkriptionsfaktor in Bezug auf hämatopoetische Entwicklungsprozesse und leukämisches Potenzial identifiziert. Somit werden weitere Untersuchungen dieses Transkriptionsfaktors auch in Zukunft für die genauere Erforschung der Hämatopoese und Leukämogenese von Bedeutung sein.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AGM-Region	Aorten-Gonaden-Mesonephros-Region
ALL	akute lymphatische Leukämie(n)
AML	akute myeloische Leukämie(n)
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
CD	Zelluläre Oberflächenproteine auf Zellen des Immunsystems
CLL	chronische lymphatische Leukämie(n)
CLPs	gesamte lymphoide Vorläufer ( <i>Common Lymphoid Progenitors</i> )
CML	chronische myeloische Leukämie(n)
CMPs	gesamte myeloide Vorläufer ( <i>Common Myeloid Progenitors</i> )
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor ( <i>Colony Stimulating Factor</i> )
CIS	<i>Common Integration Site</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>env</i>	Gen für retrovirale Hüllproteine
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FITC	Fluorescein
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
<i>gag</i>	Gen für retrovirale Kapsidproteine
G-CSF	Granulozyten-CSF
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-CSF
GMPs	granulozytäre/monozytäre-Vorläufer ( <i>Granulocyte/Monocyte-Progenitors</i> )
Gy	Gray
HI-Virus	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horse-Radish Peroxidase</i> )
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
ICSBP	<i>Interferon Consensus Sequence Binding Protein</i>
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
LCA	Oberflächenprotein auf Leukozyten
LSZ	leukämische Stammzelle
LT-HSZ	<i>Long Term-HSZ</i>
MADS	<u><i>MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response</i></u>

---

M-CSF	Monozyten/Makrophagen-CSF
MEPs	Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer ( <i>Megakaryocyte/Erythrocyte- Progenitors</i> )
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
Mmp	Matrix-Metalloprotease
MPPs	Multipotente Vorläuferzellen ( <i>Multipotent Progenitors</i> )
Mo-MLV	Moloney Murines Leukämievirus
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<i>pol</i>	Gen für retrovirale Polymerase-Enzyme
<i>rev</i>	Gen für retrovirales regulatorisches Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rounds per Minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
ST-HSZ	<i>Short Term-HSZ</i>

## 8. Literaturverzeichnis

1. Campbell, N.A. *Biologie*. (Spektrum Akademischer Verlag: 1998).
2. Eilken, H.M., Nishikawa, S. & Schroeder, T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* **457**, 896-900(2009).
3. Lancrin, C. u. a. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**, 892-5(2009).
4. Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I. & Nishikawa, S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* **446**, 1056-61(2007).
5. Taoudi, S. u. a. Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver. *Development* **132**, 4179-91(2005).
6. Mikkola, H.K.A. & Orkin, S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733-44(2006).
7. Huang, X., Cho, S. & Spangrude, G.J. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* **14**, 1851-9(2007).
8. Kucia, M. u. a. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* **23**, 879-94(2005).
9. Passegué, E. u. a. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11842-9(2003).
10. Laiosa, C.V., Stadtfeld, M. & Graf, T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* **24**, 705-38(2006).
11. Chen, M.J. u. a. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* **457**, 887-91(2009).
12. Friedman, A.D. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **21**, 3377-90(2002).
13. Rosmarin, A.G., Yang, Z. & Resendes, K.K. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* **33**, 131-43(2005).
14. Rosenbauer, F. & Tenen, D.G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* **7**, 105-17(2007).
15. Porse, B.T. u. a. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* **107**, 247-58(2001).
16. Li, Y. u. a. Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* **98**, 2958-

- 65(2001).
17. Rosenbauer, F. u. a. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* **36**, 624-30(2004).
  18. Rosenbauer, F. u. a. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nat Genet* **38**, 27-37(2006).
  19. Calkhoven, C.F., Müller, C. & Leutz, A. Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med* **8**, 577-83(2002).
  20. Pabst, T. u. a. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* **27**, 263-70(2001).
  21. Schwieger, M. u. a. A dominant-negative mutant of C/EBPalpha, associated with acute myeloid leukemias, inhibits differentiation of myeloid and erythroid progenitors of man but not mouse. *Blood* **103**, 2744-52(2004).
  22. Porse, B.T. u. a. Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* **202**, 85-96(2005).
  23. Stopka, T. u. a. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* **24**, 3712-23(2005).
  24. Rangatia, J. u. a. Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBP alpha is critical for granulocytic lineage commitment. *Mol Cell Biol* **22**, 8681-94(2002).
  25. Tamura, T. u. a. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* **13**, 155-65(2000).
  26. Tamura, T. u. a. Identification of target genes and a unique cis element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood* **106**, 1938-47(2005).
  27. Haberland, M., Montgomery, R.L. & Olson, E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32-42(2009).
  28. Enver, T., Heyworth, C.M. & Dexter, T.M. Do stem cells play dice? *Blood* **92**, 348-51; discussion 352(1998).
  29. Metcalf, D. Cell-cell signalling in the regulation of blood cell formation and function. *Immunol Cell Biol* **76**, 441-7(1998).
  30. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846-52
  31. Miranda, M.B. & Johnson, D.E. Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation. *Leukemia* **21**, 1363-77(2007).
  32. Miranda, M.B. u. a. Cytokine-induced myeloid differentiation is dependent on activation of the MEK/ERK pathway. *Leuk Res* **29**, 1293-306(2005).

33. Tanaka, T. u. a. The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol* **16**, 3967-79(1996).
34. Ross, S.E. u. a. Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. *Mol Cell Biol* **24**, 675-86(2004).
35. Miranda, M.B. u. a. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X(L)and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia* **17**, 390-400(2003).
36. Akute und chronische Leukämien. auf <<http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/e20>>
37. Bennett, J.M. u. a. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**, 451-8(1976).
38. Tenen, D.G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* **3**, 89-101(2003).
39. Rosenbauer, F. u. a. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood* **106**, 1519-24(2005).
40. Mueller, B.U. u. a. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 998-1007(2002).
41. Hope, K.J., Jin, L. & Dick, J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* **5**, 738-43(2004).
42. Rizo, A. u. a. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R210-9(2006).
43. Armstrong, S.A. u. a. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**, 41-7(2002).
44. Wei, J. u. a. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell* **13**, 483-95(2008).
45. Krivtsov, A.V. & Armstrong, S.A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**, 823-33(2007).
46. Sorensen, P.H. u. a. Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest* **93**, 429-37(1994).
47. Hess, J.L. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* **10**, 500-7(2004).
48. Milne, T.A. u. a. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**, 1107-17(2002).
49. Nakamura, T. u. a. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a

- supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**, 1119-28(2002).
50. Popovic, R. & Zeleznik-Le, N.J. MLL: how complex does it get? *J Cell Biochem* **95**, 234-42(2005).
  51. Ayton, P.M. & Cleary, M.L. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* **20**, 5695-707(2001).
  52. Lavau, C. u. a. Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J* **16**, 4226-37(1997).
  53. Zeisig, B.B. u. a. The oncoprotein MLL-ENL disturbs hematopoietic lineage determination and transforms a biphenotypic lymphoid/myeloid cell. *Oncogene* **22**, 1629-37(2003).
  54. Zeisig, B.B. u. a. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* **24**, 617-28(2004).
  55. Cozzio, A. u. a. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* **17**, 3029-35(2003).
  56. Ayton, P.M. & Cleary, M.L. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* **17**, 2298-307(2003).
  57. Krivtsov, A.V. u. a. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**, 818-22(2006).
  58. Somervaille, T.C.P. & Cleary, M.L. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**, 257-68(2006).
  59. Eklund, E.A. The role of HOX genes in malignant myeloid disease. *Curr Opin Hematol* **14**, 85-9(2007).
  60. Valk, P.J.M. u. a. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **350**, 1617-28(2004).
  61. Jonkers, J. & Berns, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 29-57(1996).
  62. Holtschke, T. u. a. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* **87**, 307-17(1996).
  63. Schüler, A. u. a. The MADS transcription factor Mef2c is a pivotal modulator of myeloid cell fate. *Blood* **111**, 4532-41(2008).
  64. Scheller, M. u. a. Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein. *Blood* **94**, 3764-71(1999).
  65. Black, B.L. & Olson, E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte

- enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-96(1998).
66. Potthoff, M.J. & Olson, E.N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* **134**, 4131-40(2007).
67. Lin, Q. u. a. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**, 1404-7(1997).
68. Bi, W., Drake, C.J. & Schwarz, J.J. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol* **211**, 255-67(1999).
69. Verzi, M.P. u. a. The transcription factor MEF2C is required for craniofacial development. *Dev Cell* **12**, 645-52(2007).
70. Arnold, M.A. u. a. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* **12**, 377-89(2007).
71. Li, H. u. a. Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9397-402(2008).
72. McKinsey, T.A., Zhang, C.L. & Olson, E.N. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* **27**, 40-7(2002).
73. Shin, H.M. & Han, T.H. CD28-mediated regulation of the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor in Jurkat T cells. *Mol Immunol* **36**, 197-203(1999).
74. Han, J. u. a. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**, 296-9(1997).
75. Yuki, Y. u. a. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci* **95**, 503-7(2004).
76. Du, Y. u. a. Cooperating cancer-gene identification through oncogenic-retrovirus-induced insertional mutagenesis. *Blood* **106**, 2498-505(2005).
77. Robles, P. & Pelaz, S. Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* **49**, 633-43(2005).
78. Prochazka, M. u. a. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3290-4(1992).
79. Kühn, R. u. a. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-9(1995).
80. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. (Cold Spring Harbor Laboratory: 2000).
81. Laird, P.W. u. a. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293(1991).
82. Saiki, R.K. u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91(1988).

83. Lu, J. u. a. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* **6**, 233-44(2000).
84. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7(1977).
85. Moriuchi, M. u. a. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* **159**, 4322-9(1997).
86. Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9(2005).
87. Mao, Z. u. a. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* **286**, 785-90(1999).
88. Mao, Z. & Wiedmann, M. Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* **274**, 31102-7(1999).
89. Yu, B.D. u. a. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**, 505-8(1995).
90. Kumar, A.R. u. a. Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood* **103**, 1823-8(2004).
91. Yokoyama, A. u. a. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**, 207-18(2005).
92. Faber, J. u. a. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* **113**, 2375-85(2009).
93. Bleul, C.C. u. a. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**, 1101-9(1996).
94. Möhle, R. u. a. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* **91**, 4523-30(1998).
95. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901-10(2005).
96. Wright, D.E. u. a. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* **195**, 1145-54(2002).
97. Busillo, J.M. & Benovic, J.L. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 952-63(2007).
98. Kulbe, H. u. a. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol* **48**, 489-96(2004).
99. Wang, J. u. a. Constitutive association of cell surface CCR5 and CXCR4 in the presence of CD4. *J Cell Biochem* **93**, 753-60(2004).
100. Isik, N., Hereld, D. & Jin, T. Fluorescence resonance energy transfer imaging

- reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS ONE* **3**, e3424(2008).
101. Cheng, Z.J. u. a. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* **275**, 2479-85(2000).
  102. Spoo, A.C. u. a. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* **109**, 786-91(2007).
  103. Somerville, R.P.T., Oblander, S.A. & Apte, S.S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* **4**, 216(2003).
  104. Stefanidakis, M. & Koivunen, E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* **108**, 1441-50(2006).
  105. Steidl, U. u. a. Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nat Genet* **38**, 1269-77(2006).
  106. Yi, F., Jaffe, R. & Prochownik, E.V. The CCL6 chemokine is differentially regulated by c-Myc and L-Myc, and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res* **63**, 2923-32(2003).
  107. Kondo, M. u. a. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**, 383-6(2000).
  108. Dahl, R. u. a. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* **4**, 1029-36(2003).
  109. Pollard, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**, 71-8(2004).
  110. Hestdal, K. u. a. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **147**, 22-8(1991).
  111. Lord, K.A. u. a. Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* **13**, 841-51(1993).
  112. Gaynor, R., Simon, K. & Koeffler, P. Expression of c-jun during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Blood* **77**, 2618-23(1991).
  113. Reddy, V.A. u. a. Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* **100**, 483-90(2002).
  114. Behre, G. u. a. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem* **274**, 4939-46(1999).
  115. Li, A.C. u. a. The macrosialin promoter directs high levels of transcriptional activity in

- macrophages dependent on combinatorial interactions between PU.1 and c-Jun. *J Biol Chem* **273**, 5389-99(1998).
116. Wang, D. u. a. C/EBPalpha directs monocytic commitment of primary myeloid progenitors. *Blood* **108**, 1223-9(2006).
117. Kato, Y. u. a. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* **16**, 7054-66(1997).
118. Wei, X. u. a. MEF2C regulates c-Jun but not TNF-alpha gene expression in stimulated mast cells. *Eur J Immunol* **33**, 2903-9(2003).
119. Stehling-Sun, S. u. a. Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c. *Nat Immunol* **10**, 289-96(2009).
120. Wilker, P.R. u. a. Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nat Immunol* **9**, 603-12(2008).
121. Khiem, D. u. a. A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17067-72(2008).
122. Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* **4**, 549-53(1969).
123. Lebkowski, J.S., Clancy, S. & Calos, M.P. Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression. *Nature* **317**, 169-71
124. Hartley, J.W. & Rowe, W.P. Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* **65**, 128-34(1975).
125. Dexter, T.M. u. a. Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J Exp Med* **152**, 1036-47(1980).
126. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-6(2000).
127. Dull, T. u. a. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463-71(1998).
128. Beyer, W.R. u. a. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* **76**, 1488-95(2002).
129. Weber, K. u. a. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* **16**, 698-706(2008).
130. Karasuyama, H. & 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* **18**, 97-104(1988).
131. Kitamura, K., Yoshida, C. & Nishigaki, K. GFPs of insertion mutation generated by molecular size-altering block shuffling. *FEBS Lett* **555**, 483-8(2003).

132. ZAFES, Zentrum für Arzneimittelforschung, -entwicklung und -sicherheit der Goethe Universität Frankfurt/Main, [www.zafes.de](http://www.zafes.de)
133. Graf, T. und Trumpp, A. Haematopoietic stem cells, niches and differentiation pathways, *Nat Rev Immunol*, online Poster (<http://www.nature.com/nri/posters/hsc/index.html>), Stand April 2009

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Carol Stocking für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas und der Möglichkeit, diese Arbeit am HPI anzufertigen. Besonders die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und der Ideenaustausch, sowie die sehr gute Arbeitsatmosphäre waren von besonderer Bedeutung für das Entstehen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Thomas Dobner möchte ich mich herzlich bedanken, dass er mir durch sein Interesse und die Betreuung des Promotionsvorhabens die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Bei Herrn Prof. Robert Slany des Lehrstuhls für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg möchte ich mich für die Bereitstellung einer M/E-Zelllinie, sowie hilfreiche Informationen zur Funktion von MLL und MLL-Fusionsproteinen, bedanken.

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

Ein großes Dankeschön gilt meinen KollegInnen der Abteilung Molekulare Pathologie. Besonders die Expertise aller technischen Assistentinnen erleichterte mir die Arbeit während der gesamten Zeit. Von ebensolcher Bedeutung waren die konstruktiven Diskussionen und die gute Zusammenarbeit mit den Postdocs der Abteilung, sowie mit meinen Mitstreiterinnen.

Bei Afra Engelmann und Uwe Schumacher möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie in mühevoller Kleinarbeit Korrekturen des Manuskriptes der vorliegenden Arbeit durchgeführt haben, sowie bei Daniel Bayer für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der kumulativen Überlebenskurven.

Bei Birte, Afra, Marion, Susanne und Ulla möchte ich mich für die vielen privaten Aufmerksamkeiten, besonders während der sehr schweren Zeit zu Beginn dieser Arbeit, von ganzem Herzen bedanken. Ihr habt mir den Neustart in Hamburg erst ermöglicht.

*Last but not least*, geht mein Dank an alle, die mich während der letzten Jahre begleitet haben und auf diese Weise alle Höhen und Tiefen gemeinsam mit mir genossen oder ertragen haen. Besonders Micha möchte ich danken, dass er meinem Tunnelblick in den letzten Monaten immer mit Humor entgegenstand ;-). Du bist der Beste!

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Ich habe mich keiner weiteren Hilfsmittel als den angegebenen bedient und alle aus der Literatur übernommenen Angaben kenntlich gemacht. Personen, die mir Hilfestellung leisteten sind namentlich genannt.

Hamburg, den