Funktion des Transkriptionsfaktors Runx1 in der frühen B-Zellentwicklung in *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Neele-Margarete Kriebitzsch
geboren in Wilhelmshaven

Hamburg, November 2014

1. Gutachterin: Carol Stocking, PhD

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Tag der Disputation: 13.02.2015

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2011 bis November 2014 am Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Forschungsgruppe Retrovirale Pathogenese unter Leitung von Frau Carol Stocking, PhD.

Teile dieser Arbeit sind in Niebuhr et al. (2013): Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development. Blood 122, 413-423 veröffentlicht worden.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 Hämatopoese 3

2.2 Die B-Zellentwicklung 5

2.2.1 Unreife B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen 5

2.2.2 Charakterisierung der frühen B-Zellvorläufer 6

2.2.3 Wichtige Rezeptoren während der frühen B-Zellentwicklung 8

2.2.3.1 Der FLT3-Rezeptor 8

2.2.3.2 Der Interleukin-7-Rezeptor 10

2.2.4 Die Rolle des Prä-B-Zellrezeptors in der frühen B-Zellentwicklung 12

2.2.4.1 Die Struktur des Prä-BZR im Vergleich zum BZR 13

2.2.4.2 Die Kontrollpunkt-Funktion des Prä-BZR 14

2.2.4.3 Der Prä-BZR-Signalweg 15

2.2.4.4 Kooperation von IL-7R und Prä-BZR in frühen Prä-B-Zellen 17

2.2.5 Ein Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren beeinflusst die Differenzierung der frühen Vorläuferzellen 19

2.2.5.1 Funktion und Regulation von Transkriptionsfaktoren 19

2.2.5.2 Multipotente Progenitorzellen: lymphoide vs. myeloide Entwicklung 21

2.2.5.3 Frühe B-Zellvorläufer: B-Zellspezifikation und Reifung 23

2.2.5.4 Prä-B-Zellvorläufer: Weitere Differenzierung zu unreifen B-Zellen 24

2.3 Der Transkriptionsfaktor Runx1 26

2.3.1 Runx-Proteine und deren Struktur 26

2.3.2 Die Rolle von Runx1 in der Leukämogenese 27

2.3.3 Runx1 in der murinen Hämatopoese 28

3 FRAGESTELLUNG 30

4 MATERIAL UND METHODEN 31

4.1 Material 31

4.1.1 Geräte 31

4.1.2 Software für bioinformatische Analysen 31

4.1.3 Medien 32

4.1.3.1 Bakterienkulturmedien 32

4.1.3.2 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur 32

4.1.4 Puffer 33

4.1.4.1 DNA-analytische Methoden 33

4.1.4.2 Proteinbiochemische Methoden 33
4.1.5 Enzyme 34
4.1.6 Antikörper und Inhibitoren 34
4.1.6.1 Antikörper 34
4.1.6.2 Inhibitoren 36
4.1.7 Kits 36
4.1.8 Oligonukleotide 37
4.1.9 Bakterienstämme 39
4.1.10 Mausstämme 40
4.1.10.1 Konditionaler *Runx1 knockout* 40
4.1.10.2 B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J (*Rag1*$^{-/-}$) 40
4.1.10.3 C57BL/6J 40
4.1.11 Zellen 40
4.1.11.1 Primäre Zellen 40
4.1.11.2 Zelllinien 40
4.1.12 Vektoren 41
4.2 Methoden 43
4.2.1 Zellbiologische Methoden 43
4.2.1.1 Kontinuierliche Kultivierung von adhärenten Zellen 43
4.2.1.2 Kontinuierliche Kultivierung von Suspensionszellen 43
4.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen 43
4.2.1.4 Herstellung retroviraler Pseudotypen 43
4.2.1.5 Titerbestimmung mittels FACS-Analyse 44
4.2.1.6 Transduktion von Zielzellen 44
4.2.1.7 Tamoxifeninduktion 45
4.2.1.8 Durchflusszytometrie – FACS-Analyse 45
4.2.1.9 Durchflusszytometrie – FACS-Sortierung 46
4.2.1.10 Kompetitionsassay in BMiFLT3-Zellen 46
4.2.2 Tierexperimentelle Methoden 47
4.2.2.1 Identifikation transgener Mäuse 47
4.2.2.2 Isolierung von murinem Knochenmark 47
4.2.2.3 Analyse von B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mäusen 47
4.2.3 Nukleinsäure-analytische Methoden 47
4.2.3.1 Standardmethoden 47
4.2.3.2 RNA-Isolierung 48

4.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) 48
4.2.3.4 Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR) 48
4.2.3.5 Chromatinimmunpräzipitation-DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq) 49
4.2.3.6 3C-Analyse des *Ikzf3* Genlocus 50
4.2.4 Proteinbiochemische Methoden 51
4.2.4.1 Stimulation des Prä-BZR-Signalwegs in Oct-Zellen sowie *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen 51
4.2.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten 51
4.2.4.3 Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten 52
4.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford 52
4.2.4.5 Immunpräzipitation 52
4.2.4.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 53
4.2.4.7 Westernblot und immunologische Detektion 53
5 ERGEBNISSE 54
5.1 Charakterisierung des Differenzierungsblocks im B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodell sowie Identifizierung zugehöriger Runx1-Zielgene 54
5.1.1 Konditionales *Runx1 knockout* Mausmodell: Ein Verlust der Runx1-Funktion führt zu einem Differenzierungsblock im Prä-B-Zellstadium 54
5.1.2 Die Runx1-Zielgene werden differentiell exprimiert 56
5.1.3 Analyse direkter Runx1-Zielgene in frühen B-Zellvorläufern 58
5.1.3.1 Induzierbare Überexpression von RUNX1 in einer Pro-B-Zelllinie 59
5.1.3.2 Identifizierung direkter Runx1-Zielgene mittels Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen: Runx1 bindet bevorzugt an *Enhancer*-Bereiche in der DNA 60
5.2 Analyse der *Enhancer*-Promotor-Interaktionen im *Ikzf3*-Locus 64
5.3 Die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B werden stromabwärts des Prä-BZRs verstärkt exprimiert 68
5.3.1 Bestätigung der differenziellen Expression in einem induzierbaren Prä-B-Zellsystem 68
5.3.2 Bestätigung der differentiellen Expression der Runx1-Zielgene in einem induzierbaren Pro-B-Zellsystem 70
5.3.2.1 Etablierung einer induzierbaren Pro-B-Zelllinie aus *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen 70
5.3.2.2 Analyse der Genexpression in transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen auf mRNA- und Proteinebene 72
5.4 Wie wird die Aktivität von Runx1 in den frühen B-Zellvorläufern reguliert? 73
5.4.1 Runx1 wird stromabwärts des Prä-BZRs phosphoryliert 74
5.4.2 Die Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein ist notwendig für die Expression bestimmter Zielgene 76
5.4.2.1 Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten 76

5.4.2.2 Die Überexpression der RUNX1-Phosphorylierungsmutanten beeinflusst die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* 78

5.4.2.3 Die verstärkte Expression von Aiolos und Spi-B nach RUNX1-Überexpression kann durch spezifische Kinase-Inhibitoren relativiert werden..... 82

6 DISKUSSION 85

6.1 Runx1: ein wichtiger Transkriptionsfaktor stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung 85

6.1.1 Der Verlust der Runx1-Aktvität führt zu einem Differenzierungsblock in frühen Prä-B-Zellen 85

6.1.2 Zwei Gruppen von Zielgenen beeinflussen den Block in der frühen B-Zelldifferenzierung und werden stromabwärts des Prä-BZRs aktiviert..... 86

6.1.3 Runx1 reguliert seine Zielgene durch Bindung an *Enhancer*-Elemente 89

6.2 Die Regulation der Runx1-Aktivität in frühen B-zellspezifischen Progenitoren 91

6.2.1 Die Aktivierung spezifischer Zielgene in frühen Prä-B-Zellen wird durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht 91

6.2.2 Die Phosphorylierung von Runx1 stromabwärts des Prä-BZRs führt zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität 93

6.3 Runx1 beeinflusst die Differenzierung in Prä-B-Zellen durch ein Netzwerk an differenzierungsfördernden Interaktionen..... 96

6.4 Die Rolle der Runx1-Zielgene bei der Entstehung einer t(12;21) assoziierten Prä-B-zellspezifischen Leukämie 98

7 LITERATURVERZEICHNIS 100

8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....113

9 ANHANG.....115

9.1 Abkürzungsverzeichnis 115

9.2 Summary 117

1 Zusammenfassung

Die frühe B-Zellentwicklung ist durch eine geordnete Umlagerung der Gen-Loci gekennzeichnet, die für die schwere und die leichte Kette des B-Zellrezeptors (BZRs) kodieren. Die erfolgreiche Rekombination dieser Immunglobulin-Loci wird hierbei an verschiedenen Kontrollpunkten überprüft. So wird die Rekombination der schweren Kette des BZRs analysiert, indem diese zusammen mit der Ersatz-leichten-Kette (*surrogate light chain*) als Prä-B-Zellrezeptor (Prä-BZR) auf der Zelloberfläche der frühen Prä-B-Zellen transient exprimiert wird. Durch die Signaltransduktion des Prä-BZRs wird an diesem wichtigen Kontrollpunkt die Proliferation, aber auch die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen reguliert. Dysregulationen in den Prä-BZR-abhängigen Signalwegen können zur malignen Transformation der B-Zellprogenitoren beitragen und die Entstehung Prä-B-zellspezifischer akuter lymphoider Leukämien (Prä-B-ALLs) begünstigen. Besonders häufig ist die Translokation t(12;21), die zur Expression des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins führt, in Prä-B-ALLs zu finden. Für das Fusionsprotein wird eine dominant-negative Inhibierung der RUNX1-Zielgene postuliert. Runx1 gehört zu den zentralen Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese und ist an vielen Prozessen beteiligt, die die myeloide aber auch die lymphoide Entwicklung von Vorläuferzellen beeinflussen. Interessanterweise zeigen konditionale *knockout* Mausmodelle bei Verlust der Runx1-Funktion einen Block in der frühen B-Zelldifferenzierung, sodass die Aktivität von Runx1 für die Entwicklung dieser Vorläuferzellen unerlässlich zu sein scheint. Dennoch ist bisher nicht viel über die genaue Funktion von Runx1 und Runx1-regulierte Zielgene in der frühen B-Zellentwicklung und insbesondere am Prä-BZR-Kontrollpunkt bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein besseres Verständnis über die Runx1-abhängige transkriptionelle Regulation in den frühen B-Vorläuferzellen zu erhalten. In der hier vorliegenden Arbeit konnte mithilfe eines konditionalen *Runx1 knockout* Mausmodells der Block in der B-Zelldifferenzierung stromabwärts des Prä-BZR-Kontrollpunkts beim Übergang in späte Prä-B-Zellen detektiert werden. Weiterhin wurden zwei Gruppen von Runx1-Zielgenen gefunden, für die bereits Funktionen innerhalb der Prä-B-Zellpopulationen diskutiert werden. Diese beiden Gruppen umfassen (1) Mitglieder der Lyn-Src-Kinase-Familie wie Hck und Blk sowie (2) die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B. Durch eine genomweite Analyse der Runx1-DNA-Bindungsstellen konnte die direkte Bindung vor allem an *Enhancer*-Elemente der identifizierten Runx1-Zielgene festgestellt werden. Mithilfe einer 3C-Analyse wurde darüber hinaus ein *Looping* in dem für Aiolos kodierenden *Ikzf3*-Locus zwischen dem Runx1-gebundenen *Enhancer*-Bereich und nah am Promotor gelegenen DNA-Abschnitten nachgewiesen und so ein möglicher Mechanismus identifiziert, wie Runx1 bei Bindung an *Enhancer* die spezifische Expression seiner Zielgene direkt beeinflussen könnte.

Zusammenfassung

Die Aktivierung zelltypspezifischer Zielgene ist für die Differenzierung von Vorläuferzellen essentiell und wird durch komplexe transkriptionelle Netzwerke reguliert. Durch die Analyse der Prä-BZR-abhängigen Aktivierung von Runx1-Zielgenen und durch die Untersuchung der Phosphorylierungslevel von Runx1 vor und nach der Prä-BZR-Signalgebung konnten in der hier vorliegenden Arbeit mehrere Runx1-regulierte transkriptionelle Netzwerke identifiziert werden. Diese beinhalten unter anderem die sogenannten „Feedforward“ Motive und fördern daher die Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen nach Aktivierung des Prä-BZRs. Es konnte gezeigt werden, dass Runx1 in einem ersten Netzwerk zunächst die Expression der Lyn-Src-Kinasen induziert. Nach Stimulation des Prä-BZRs phosphorylieren diese anschließend bestimmte Tyrosinreste im Runx1-Protein, wodurch die transkriptionelle Aktivität von Runx1 spezifisch verstärkt wird. In der Folge kann Runx1 die Expression differenzierungsfördernder Zielgene wie *Ikzf3* und *Spib* aktivieren. Aufgrund der in dieser Arbeit identifizierten Ko-Lokalisation der DNA-Bindungsmotive von Runx1 und Spi-B wurde zudem postuliert, dass Runx1 in einem weiteren regulatorischem Netzwerk zunächst zusammen mit B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie E2A und Pax5 die Expression von *Spib* induziert. Im Anschluss wiederum interagieren Runx1 und Spi-B und regulieren gemeinsam weitere Prä-B-zellspezifische Zielgene, die die Differenzierung in unreife B-Zellen vorantreiben.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Runx1 am Prä-BZR-Kontrollpunkt die Aufgabe eines zentralen Regulators in verschiedenen transkriptionellen Netzwerken übernimmt. Die Aktivität von Runx1 am Prä-BZR-Kontrollpunkt ist somit für die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen essentiell. Bei Verlust der Runx1-Funktion in ETV6-RUNX1 exprimierenden Zellen können diese transkriptionellen Netzwerke nicht mehr aufrechterhalten werden. In der Folge können differenzierungsfördernde Gene wie *IKZF3* und *SPIB* stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung nicht mehr aktiviert werden, sodass die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung am Prä-BZR-Kontrollpunkt nicht mehr gewährleistet ist und die Zellen in einen prä-leukämischen Zustand versetzt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse könnten somit dazu beitragen, neue spezifische Therapieansätze zu entwickeln, die der störenden Funktion des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins entgegenwirken.

2 Einleitung

2.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt den Vorgang der Bildung aller im Blut vorkommenden Zellen ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle (HSZ). Dabei werden die primitive und die adulte Hämatopoese voneinander unterschieden. Die primitive bzw. embryonale Hämatopoese findet ausschließlich während der frühen Embryonalentwicklung in dem aus dem Mesoderm abstammenden Dottersack und später vorrübergehend in der fetalen Leber statt. Sie dient unter anderem der Bildung sogenannter Blutinseln aus kernhaltigen Erythrozyten, die nach Ausbildung eines Gefäßsystems an der Sauerstoffversorgung des Embryos teilnehmen (Cumano & Godin, 2007). Im Gegensatz dazu bezeichnet die adulte bzw. definitive Hämatopoese den Prozess der kontinuierlichen Bildung aller Zellen des Blutes aus einer pluripotenten HSZ nach der Geburt und findet im Knochenmark statt. Die HSZ weist dabei zwei herausragende Eigenschaften auf: zum einen besitzt sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zum anderen kann sie, wie bereits erwähnt, in alle hämatopoetischen Zelltypen ausdifferenzieren (Weissman, 2000; Corfe & Paige, 2012). Beeinflusst werden diese beiden gegensätzlichen Eigenschaften durch das Vorhandensein von bestimmten Regionen im Knochenmark, sogenannten Nischen. Diese sind unter anderem durch verschiedene Stromazellen sowie durch die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine von umliegenden Zellen charakterisiert. Hierdurch wird die Bestimmung der HSZ reguliert und das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung aufrechterhalten (Morrison & Scadden, 2014).

Es konnten bisher mindestens drei Klassen von hämatopoetischen Stammzellen identifiziert werden, die in LT-HSZ (*long-term* HSZ), IT-HSZ (*intermediate-term* HSZ) sowie ST-HSZ (*short-term* HSZ) unterteilt werden können und sich unter anderem anhand ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung unterscheiden. LT-HSZ weisen eine uneingeschränkte Selbsterneuerungskapazität auf, während diese bei IT-HSZ auf einen Zeitraum von sechs bis acht Monaten beschränkt ist. ST-HSZ hingegen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung maximal acht Wochen (Morrison & Weissman, 1994; Benveniste et al., 2010; Frelin et al., 2013). Die ST-HSZ differenzieren schließlich über die Stufe der multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) weiter in noch stärker determinierte Vorläuferzellen, die die weitere Entwicklung in die myeloide (CMPs) bzw. in die lymphoide (LMPPs) Linie fördern. CMPs differenzieren im Folgenden über mehrere unterschiedliche Vorläuferstadien in Erythrozyten, Megakaryozyten bzw. Monozyten und Granulozyten. Erythrozyten sind für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich, während Megakaryozyten die für die Blutgerinnung wichtigen Thrombozyten freisetzen. Monozyten und Granulozyten hingegen sind an der angeborenen Immunabwehr beteiligt und können unter anderem durch Phagozytose Krankheitserreger neutralisieren. Monozyten können zusätzlich Fremdantigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und durch Ausschüttung von Zytokinen die weitere Immunantwort aktivieren (Murphy et al., 2009). Die LMPPs (*lymphoid-primed multipotent progenitors*)

differenzieren bevorzugt zu den allgemeinen lymphoiden Vorläufern (CLPs), können jedoch ebenfalls zu granulozytären/monozytären Vorläuferzellen ausdifferenzieren (Adolfsson et al., 2005; Mansson et al., 2007). Im weiteren Verlauf der lymphoiden Linie können die CLPs in NK-Zellen sowie in Zellen der T- oder B-Zelllinie differenzieren. NK-Zellen (natürliche Killerzellen) spielen ebenfalls eine Rolle in der angeborenen Immunantwort. Sie können durch die Expression spezifischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche unter anderem virusinfizierte Zellen erkennen und in diesen Zellen den gezielten Zelltod (Apoptose) auslösen. Reife T- und B-Zellen hingegen sind in der adaptiven Immunantwort involviert, die in zwei Bereiche unterteilt werden kann. Zytotoxische T-Zellen erkennen in der zellulären Immunantwort Fremdantigen-präsentierende Zellen und zerstören diese durch Ausschüttung von Granzym B und Perforin. In der humoralen Immunantwort wiederum werden durch das Zusammenspiel von Helfer-T-Zellen und B-Zellen letztere aktiviert und sezernieren im weiteren Verlauf als Plasmazellen spezifische Antikörper (Immunglobuline) gegen das Fremdantigen, wodurch dieses neutralisiert wird. Ein kleiner Teil der aktivierten B-Zellen differenziert zudem in Gedächtniszellen, welche über Jahre erhalten bleiben. Bei erneutem Kontakt mit dem Fremdantigen können diese direkt aktiviert werden und so eine schnelle Immunantwort auslösen (Murphy et al., 2009). Einen weiteren Zelltyp in der Hämatopoese bilden die dendritischen Zellen (DCs), die sowohl von Vorläuferzellen der myeloiden als auch der lymphoiden Linie abstammen können (Manz et al., 2001; Ardavin, 2003). DCs stellen ein Verbindungsglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar, indem sie nicht nur Fremdantigene auf ihrer Oberfläche präsentieren, sondern durch Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren und Ausschüttung bestimmter Zytokine unter anderem gezielt naive T-Zellen aktivieren können (Mellman & Steinman, 2001).

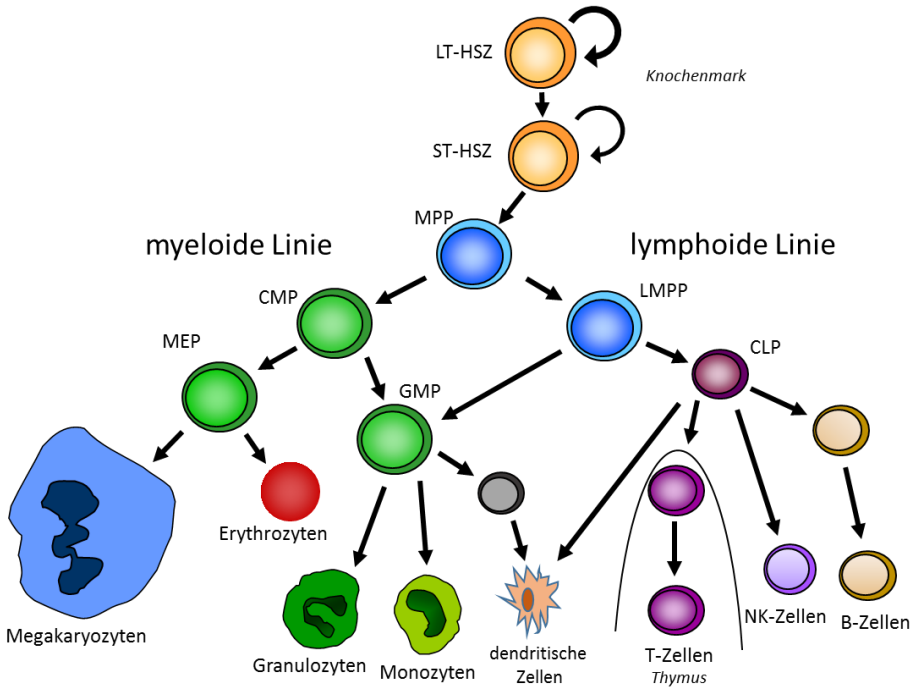


Abb. 1: Schematische Darstellung der adulten Hämatopoese.
Aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle entstehen alle Zellen des blutbildenden Systems. Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema nach dem Akashi-Kondo-Weissman-Modell. Anhand genauerer Analysen verschiedener Progenitorpopulationen in den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass der Prozess der Hämatopoese deutlich komplexer ist und weitere Vorläuferpopulationen sowie Quervernetzungen zwischen myeloider und lymphoider Linie aufweist (zusammengefasst in:(Laiosa et al., 2006; Luc et al., 2008)). LT-HSZ: *long-term* hämatopoetische Stammzelle, ST-HSZ: *short-term* hämatopoetische Stammzelle, MPP: multipotenter Progenitor, CMP: gemeinsame myeloide Vorläuferzelle, MEP: Megakaryozyten-Erytrhozyten-Progenitor, GMP: Granulozyten-Monozyten-Progenitor, LMPP: lymphoid-polarisierte multipotente Vorläuferzelle, CLP: gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle. Die geraden Pfeile bedeuten Differenzierung, die runden Pfeile stehen für den Selbsterhalt der Zelle. Modifiziert nach: (Passegue et al., 2003; Cedar & Bergman, 2011).

2.2 Die B-Zellentwicklung

In diesem Abschnitt soll die Differenzierung der B-Zellen dargestellt werden, wobei insbesondere die Entwicklung der frühen Vorläuferzellen im Knochenmark betrachtet wird. Diese frühen Differenzierungsstadien sind vor allem durch die Rekombinationsschritte der schweren und leichten Immunglobulinketten gekennzeichnet, die zur Expression eines funktionalen Prä-B-Zellrezeptors (Prä-BZR) bzw. eines funktionalen reifen B-Zellrezeptors (BZR) führen. Um die Bedeutung dieses Differenzierungspfades innerhalb der Hämatopoese zu unterstreichen, soll zuvor jedoch kurz auf die Reifung der B-Zelle zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle, die späte B-Zellentwicklung, eingegangen werden.

2.2.1 Unreife B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen

Wie bereits unter 2.1 erwähnt, dienen reife B-Zellen während der Immunabwehr zur Produktion spezifischer Antikörper (Immunglobuline), um gezielt Fremdantigene im Organismus zu bekämpfen. Es gibt insgesamt fünf Isotypen von Immunglobulinen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM), die durch unterschiedliche Effektorfunktion und Lokalisation im Körper (z.B. Schutz vor Parasiten,

Lokalisation überwiegend im Speichel) charakterisiert sind. Um eine möglichst große Vielfalt an Immunglobulinen mit unterschiedlicher Spezifität zu erhalten, erfolgt während der B-Zelldifferenzierung eine Rekombination der Gen-Loci, die für die konstanten und variablen Regionen der schweren und leichten Kette des jeweiligen Immunglobulins kodieren. Mehrere Kontrollpunkte während dieses Prozesses sind dabei für die negative Selektion von Immunglobulinen, die Selbstantigene erkennen und somit Autoimmunerkrankungen auslösen könnten, verantwortlich. Lediglich 10% der vollständig rekombinierten Immunglobuline werden positiv selektioniert und so erstmals auf der Oberfläche unreifer B-Zellen in Form eines monomeren membrangebundenen IgMs als reifer BZR exprimiert. Diese Zellen wandern in das periphere lymphatische Gewebe aus und exprimieren als nun reife B-Zellen aufgrund von alternativem mRNA *Spleißen* zusätzlich auch BZRs der Klasse IgD. Diese Zellpopulation umfasst das Repertoire aller naiven B-Zellen. Bei Kontakt des BZR dieser Zellen mit einem passenden Fremdantigen, nimmt die B-Zelle das Fremdantigen zusammen mit dem BZR ins Zellinnere auf und präsentiert dieses anschließend auf ihrer Zelloberfläche. Durch Wechselwirkung mit T-Helferzellen wird die B-Zelle schließlich vollständig aktiviert, was zu einer klonalen Expansion dieser Zellpopulation und der weiteren Differenzierung zu einer Immunglobulin-produzierenden Plasmazelle führt. Diese kann anschließend je nach benötigter Effektorfunktion einen bestimmten Immunglobulin-Isotyp sezernieren. Die freigesetzten Immunglobuline können dann als lösliche Proteine im Blut zirkulieren und das Fremdantigen spezifisch neutralisieren. Durch die zuvor beschriebenen Prozesse wird am Ende der B-Zelldifferenzierung ein möglichst großer Pool an BZR exprimierenden naiven B-Zellen erhalten, die bei Aktivierung mit einer besonders hohen Affinität an Fremdantigene binden und diese effizient neutralisieren können (Murphy et al., 2009). Da die Rekombination der Immunglobuline als wichtigster Prozess während der B-Zelldifferenzierung bereits in den frühen Progenitoren stattfindet, ist das Verständnis der frühen B-Zellvorläufer von besonderer Bedeutung.

2.2.2 Charakterisierung der frühen B-Zellvorläufer

Die ausschließlich im Knochenmark stattfindende frühe B-Zellentwicklung ist durch verschiedene Vorläuferzellen gekennzeichnet, die anhand der Expression charakteristischer Oberflächenrezeptoren identifiziert werden können. Ausgehend von der HSZ können als erstes Zellstadium, das eine in Richtung B-Zelllinie geprägte Differenzierung zeigt, die späten CLPs (auch CLP-B) identifiziert werden. Diese Zellpopulation zeigt, wie die frühen CLPs, eine Expression der Zytokinrezeptoren FLT3 und Interleukin-7-Rezeptor (IL-7R). Zusätzlich kann jedoch ab diesem Stadium der Differenzierung Ly6D auf der Zelloberfläche detektiert werden, welcher somit als Marker für die früheste B-Zell-restringierte Zellpopulation dient (Inlay et al., 2009; Tsapogas et al., 2011). Als wichtigster Marker für Vorläufer-B-Zellen ab dem Pro-B-Zellstadium wird CD19 verwendet, während FLT3 in diesen Vorläufern nicht mehr exprimiert wird. In Kombination mit anderen

Oberflächenrezeptoren wie CD43 können auch die späteren Progenitorpopulationen voneinander unterschieden werden. Das Stadium der unreifen B-Zellen kann schließlich durch erstmalige Expression des reifen BZRs auf der Zelloberfläche identifiziert werden, wohingegen die IL-7R-Expression herunter reguliert worden ist (Matthias & Rolink, 2005; Hardy et al., 2007). Die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker ist in Abbildung 2 zusammengefasst.

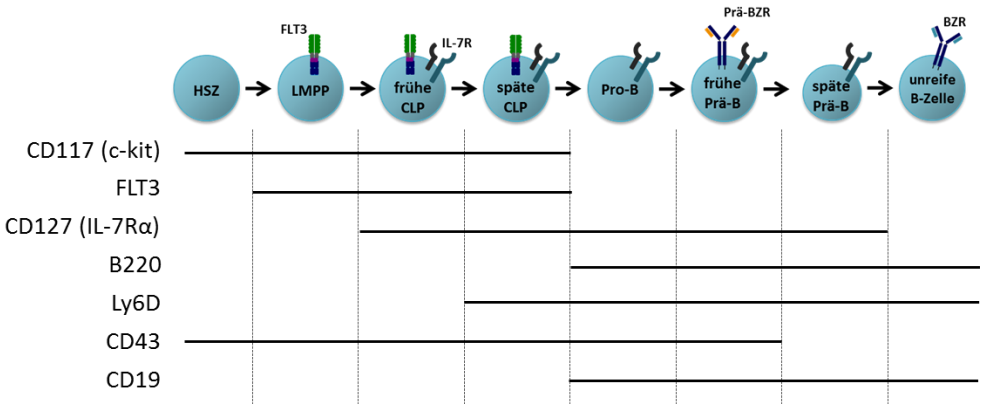


Abb. 2: Übersicht über die frühe B-Zelldifferenzierung und die Expression spezifischer Oberflächenmarker.
Zu sehen sind die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung mit Expression charakteristischer Oberflächenmarker. Anhand dieser Marker können die verschiedenen Populationen unterschieden werden. HSZ: hämatopoetische Stammzelle, LMPP: lymphoid-polarisierte multipotente Vorläuferzelle, CLP: gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle, FLT3:fms-*related tyrosine kinase 3*, IL-7Rα: α-Kette des Interleukin-7-Rezeptors. Zusammengestellt und abgewandelt nach: (Hardy et al., 2007; Inlay et al., 2009).

Das Knochenmark liefert spezifische Nischen (siehe 2.1), in denen die verschiedenen B-Zellvorläufer lokalisiert sind und deren weitere Differenzierung sie beeinflussen. So ist die Ausschüttung des Chemokins CXCL12 und des Zytokins FLT3L besonders wichtig für die Etablierung der ersten Vorläuferzellen, die bereits in Richtung der B-Zelllinie differenzieren. Für die Proliferation von Pro-B- und frühen Prä-B-Zellen hingegen ist eine hohe Konzentration des Zytokins IL-7 im Knochenmark notwendig, während späte Prä-B-Zellen in Regionen mit geringer IL-7-Konzentration lokalisiert sind. Welche Zelltypen des Knochenmarks dabei genau für die Ausschüttung der jeweiligen Faktoren verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. So wird unter anderen den Osteoblasten eine wichtige Rolle bei der Erzeugung B-zellspezifischer Nischen im Knochenmark zugeschrieben (Panaroni & Wu, 2013; Clark et al., 2014).

Neben den bereits erwähnten Zytokinrezeptoren FLT3 und IL-7R sind der Prä-BZR und dessen stromabwärts gelegene Signalwege von besonderer Bedeutung für die Differenzierung, Proliferation und das Überleben der frühen B-Zellpopulationen. Weiterhin beeinflusst ein komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren (TFs) die Entwicklung der frühen Vorläuferzellen hin zu unreifen B-Zellen, wobei auch die Expression und Aktivität der TFs zur Unterscheidung früher und später Differenzierungsstadien während der B-Zellentwicklung genutzt werden kann.

2.2.3 Wichtige Rezeptoren während der frühen B-Zellentwicklung

2.2.3.1 Der FLT3-Rezeptor

FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) gehört zur Familie der Typ III Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). RTKs sind durch eine extrazelluläre Domäne, die der Ligandenbindung dient, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären hoch-konservierten Kinasedomäne gekennzeichnet (Matsumura et al., 2008). FLT3 weist extrazellulär fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen auf, an die der FLT3-Ligand (FL) binden kann. Intrazellulär vermitteln zwei Kinasedomänen zusammen mit der Juxtamembrandomäne die Signaltransduktion (Abb. 3). Dabei gehört das Gen, das für FLT3 kodiert, zu den am stärksten von Mutationen betroffenen Genen in akuten myeloiden Leukämien (AML). Als häufigste Mutation konnte eine interne Tandemduplikation (ITD) in der Juxtamembrandomäne des Rezeptors identifiziert werden. Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Masson & Ronnstrand, 2009). In akuten lymphoiden Leukämien (ALL) hingegen sind FLT3 Mutationen insgesamt seltener zu finden. Bestimmte Subtypen der ALL, die durch eine Translokation des *MLL*-Gens oder hyperdiploide Chromosomensätze gekennzeichnet sind, weisen jedoch ebenfalls häufig aktivierende FLT3 Mutationen auf und sind durch eine hohe FLT3-Expression charakterisiert (Armstrong et al., 2003; Armstrong et al., 2004).

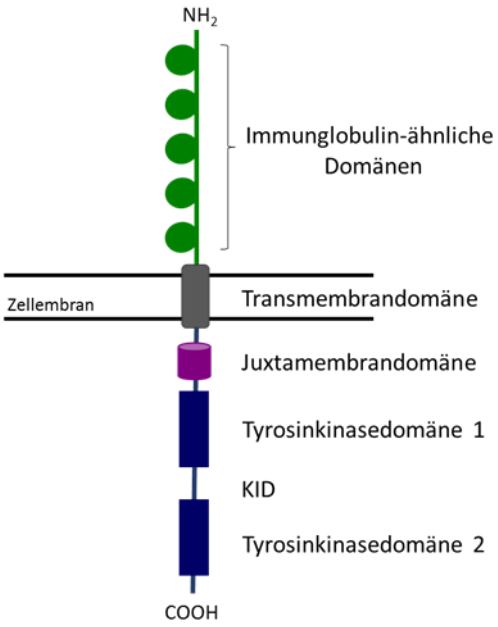


Abb. 3 Schematische Darstellung von FLT3.
Der Rezeptor besteht aus einem extrazellulären Teil mit fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen sowie aus intrazellulär liegenden Kinasedomänen, die die Signaltransduktion vermitteln. KID: Kinase-Insert-Domäne. Abgewandelt nach: (Small, 2006).

Die Expression von FLT3 ist auf die frühesten Differenzierungsstadien während der Hämatopoese beschränkt. Erstmals detektiert werden kann die Expression in einer Subpopulation der HSZ (Lin^-, $Sca\text{-}1^+$, $c\text{-}Kit^+FLT3^+$), wobei dies mit einem Verlust der Selbsterneuerungskapazität und bei hoher Expression von FLT3 mit einer verstärkt lymphoid bzw. granulozytär/monozytär geprägten Differenzierung einhergeht (Adolfsson et al., 2001; Adolfsson et al., 2005). Im weiteren Verlauf der B-Zelldifferenzierung wird die Transkription von *Flt3* im Pro-B-Zellstadium durch den B-zellspezifischen

Transkriptionsfaktor Pax5 herunterreguliert und damit die Expression des Rezeptors beendet (Holmes et al., 2006). Die Bedeutung der Signaltransduktion durch den FLT3-Rezeptor für die frühe B-Zellentwicklung konnte anhand von *Flt3*$^{-/-}$ und *Flt3l*$^{-/-}$ Mäusen gezeigt werden. Diese Mausmodelle zeigen eine Reduktion in der CLP-Population und folglich ebenfalls eine Reduktion an NK-, T- und B-Zellvorläufern, wohingegen die Population der HSZ nicht beeinflusst wird (Mackarehtschian et al., 1995; McKenna et al., 2000; Sitnicka et al., 2002).

Um die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors zu induzieren, bindet der FLT3-Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, was eine Dimerisierung zweier Rezeptor-Monomere bewirkt. Infolgedessen erfolgt intrazellulär die Transphosphorylierung der Kinasedomänen, wodurch die aktive Konformation des Rezeptors stabilisiert wird. Dabei werden verschiedene Signalwege stromabwärts von FLT3 aktiviert (Abb. 4). Der Ras/MAPK-Signalweg führt unter anderem zur Aktivierung spezifischer TFs (z.B. c-Myc) oder Zellzyklus-regulierender Faktoren, die die Proliferation und das Überleben der Vorläuferzellen beeinflussen. Ebenso reguliert die Signalgebung über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) das Überleben der Zellen, indem z.B. die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt die Aktivität pro- und anti-apoptotischer Signalmoleküle beeinflusst. Auch die Signaltransduktion stromabwärts der STAT-Proteine wirkt auf das Überleben und die Proliferation der frühen Vorläuferzellen ein. Folglich weisen alle diese Signalwege ein hohes onkogenes Potential auf, da Mutationen im FLT3-Rezeptor sowie in den erwähnten nachgeschalteten Signalwegen zu einer unkontrollierten Proliferation der unreifen Progenitoren führen können (Matsumura et al., 2008; Masson & Ronnstrand, 2009).

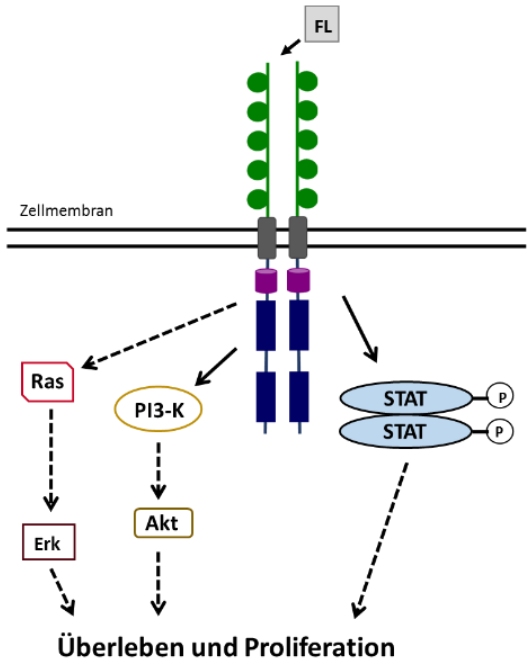


Abb. 4: Übersicht über die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors.
Durch Bindung des FLT3-Liganden werden verschiedene Signalwege, wie die PI3K/Akt- oder die Ras/MAPK-Signalkaskaden, stromabwärts des Rezeptors aktiviert. FL: FLT3-Ligand, PI3K: Phosphoinositid-3 Kinase, Akt: Serin/Threonin-Kinase Akt, STAT: *signal transducers and activators of transcription*, Ras: kleines G-Protein Ras, Erk: *Extracellular-signal regulated kinase*. Modifiziert nach: (Matsumura et al., 2008; Herzog et al., 2009).

2.2.3.2 Der Interleukin-7-Rezeptor

Der Interleukin-7-Rezeptor (IL-7R) ist ein Heterodimer bestehend aus der Untereinheit IL-7Rα sowie der γ_c-Kette und wird durch die Bindung seines Liganden Interleukin-7 (IL-7) aktiviert. Die IL-7Rα-Kette kann zudem mit der Rezeptoruntereinheit CRLF2 (*cytokine receptor-like factor 2*), die eine Homologie zur γ_c-Kette aufweist, einen aktiven Rezeptorkomplex bilden und wird durch die Bindung des Zytokins TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) aktiviert (Park et al., 2000; Palmer et al., 2008). Die γ_c-Kette ist ebenfalls an der Bildung weiterer Zytokinrezeptoren, wie den Rezeptoren für IL-2, IL-4 oder IL-9, beteiligt. Im Rezeptorkomplex aus der IL-7Rα-Kette und der γ_c-Kette beeinflusst erstere die spezifische Bindung an IL-7, wobei die Bildung des Heterodimers unerlässlich für die Signaltransduktion stromabwärts des Rezeptors ist (Noguchi et al., 1993; Ziegler et al., 1995). Aktivierende Mutationen in der extrazellulären Juxtamembrandomäne der IL-7Rα-Untereinheit führen dabei zu einer Zytokin-unabhängigen und damit konstitutiven Aktivierung der Signalwege und sind in 10% aller pädiatrischen T-ALLs zu finden. In B-Vorläufer-ALLs konnten diese Mutationen bisher in ALL-Subtypen detektiert werden, die durch eine aberrante CRLF2-Expression gekennzeichnet sind (Shochat et al., 2011; Zenatti et al., 2011).

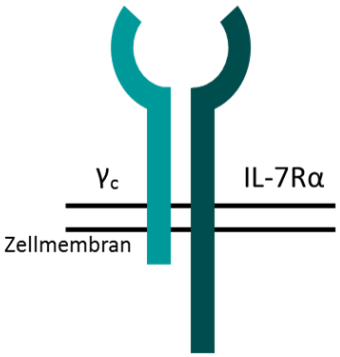


Abb. 5: Struktur des IL-7-Rezeptors.
Der Interleukin-7-Rezeptor besteht aus der α-Kette des IL-7-Rezeptors und der γ_c-Kette.

Detektiert werden kann die Expression des IL-7Rs erstmals auf den CLPs, die vor allem in die Zellen der lymphoiden Linie differenzieren. So kann der Rezeptor auf Vorläufer-T-Zellen sowie reifen T-Lymphozyten und ebenfalls auf der Zelloberfläche früher B-Zellvorläufer identifiziert werden. In der B-Zellentwicklung kann die Expression des IL-7Rs bis zum späten Prä-B-Zellstadium nachgewiesen werden, erst auf den BZR exprimierenden unreifen B-Zellen ist die Expression herunter reguliert (Sudo et al., 1993; Kondo et al., 1997b). Wie wichtig die Expression des IL-7-Rezeptors und seine nachgeschalteten Signalwege für die B-Zelldifferenzierung sind, konnte mithilfe von verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden. *Il7*$^{-/-}$, *Il7rα*$^{-/-}$ und $\gamma_c^{-/-}$ Mausmodelle zeigen einen Block in der Differenzierung in frühen Stadien der B-Zellvorläufer (Peschon et al., 1994; DiSanto et al., 1995; von Freeden-Jeffry et al., 1995; Miller et al., 2002), wobei auch die ektopische Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 diesen Differenzierungsblock nicht aufheben kann (Akashi et al., 1997; Kondo et al., 1997a). Anhand genauerer Analysen der frühesten B-Zellvorläufer in *IL7*$^{-/-}$ Mäusen

konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Expression dieses Interleukins bereits für die Differenzierung der späten CLPs unerlässlich ist. Hierbei scheint die fehlende Hochregulation des B-zellspezifischen Transkriptionsfaktors Ebf1 zum Block in der Differenzierung beizutragen (Tsapogas et al., 2011).

Zuletzt soll nun noch kurz auf die nachgeschaltete Signaltransduktion des IL-7Rs eingegangen werden. Ähnlich wie bei FLT3 werden stromabwärts vom IL-7R Signalwege reguliert, die das Überleben, die Proliferation und die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen beeinflussen (Abb. 6). Da beide Rezeptoruntereinheiten keine intrinsischen Kinasedomänen aufweisen, sind diese mit Januskinasen (JAKs) assoziiert, wobei die Bindung von IL-7 die Dimerisierung der Untereinheiten und damit die Transphosphorylierung von JAK1 und JAK3 induziert. Zusätzlich können diese Kinasen spezifische Tyrosinreste in der IL-7Rα-Untereinheit phosphorylieren, die anschließend als Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle dienen. Neben dem PI3K-Signalweg, der unter anderem eine Vielzahl von pro- und anti-apoptotischen Faktoren (z.B. Bax und Bcl-2) reguliert, beeinflusst die Aktivierung von Erk die Expression von TFs wie Myc oder Mef2c. Dabei ist die Aktivierung von Erk besonders für die Proliferation von Pro-B- und Prä-B-Zellen von Bedeutung. Vor allem ist jedoch auch die Rolle des JAK/STAT-Signalweges in den B-Zellprogenitoren zu erwähnen. STAT-Proteine werden nach IL-7-Bindung zum Rezeptorkomplex rekrutiert, dort phosphoryliert und können im Anschluss als Dimere in den Zellkern translozieren. Im Zellkern können sie als Transkriptionsfaktor die Expression spezifischer Zielgene regulieren. STAT5 ist dabei die Hauptform, die durch IL-7 aktiviert wird (zusammengefasst in: (Corfe & Paige, 2012)). Die Bedeutung der STAT5-Aktivierung für die frühe B-Zellentwicklung konnte bereits durch unterschiedliche Mausmodelle bestätigt werden. Bei einem Verlust der STAT5-Expression ist ein Block in der B-Zelldifferenzierung zu beobachten, der vergleichbar mit dem Differenzierungsblock in *IL-7R*$^{-/-}$ Mäusen ist (Hoelbl et al., 2006; Yao et al., 2006). Weiterhin kann durch Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von STAT5b in *IL7R*$^{-/-}$ Mäusen der frühe Differenzierungsblock aufgehoben und zudem eine vergrößerte Population an Pro-B-Zellen detektiert werden (Goetz et al., 2004). Dabei sind die genauen Mechanismen wie STAT5 das Überleben, die Proliferation und auch die Differenzierung der frühen B-Zellvorläufer beeinflusst zum Teil kontrovers diskutiert. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass STAT5 nach IL-7-Bindung die Expression der B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Ebf1 und Pax5 beeinflusst, was für die Differenzierung der frühen Vorläufer in Richtung B-Zellen unerlässlich ist (Dias et al., 2005; Kikuchi et al., 2008; Tsapogas et al., 2011). Ebenso ist die Rekombination der schweren Kette des BZRs von der Signaltransduktion durch STAT5 abhängig (Chowdhury & Sen, 2001; Bertolino et al., 2005; Johnson et al., 2012). Im Gegensatz zu diesen Veröffentlichungen zeigte ein konditionales *knockout* Mausmodell, in dem die Expression von STAT5 erst ab dem Pro-B-Zellstadium unterbunden ist, weder Unterschiede in der Expression von Ebf1 oder Pax5 noch einen Unterschied in der V_HDJ_H-Rekombination. Hiernach

beeinflusst die Signaltransduktion über STAT5 vor allem das Überleben der frühen Vorläuferzellen, indem der anti-apoptotische Faktor Mcl-1 hochreguliert wird (Malin et al., 2010). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Deletion von STAT5 in dieser Studie erst in bereits B-Zell-restringierten Vorläufern erfolgt, in denen die Ebf1-Expression bereits etabliert und somit nicht mehr von der Aktivierung durch STAT5 über den IL-7R abhängig sein könnte (Tsapogas et al., 2011). Das komplexe Netzwerk zwischen IL-7R- und Prä-BZR-Signalwegen in den Prä-B-Zellpopulationen wird unter 2.2.4.4 näher betrachtet.

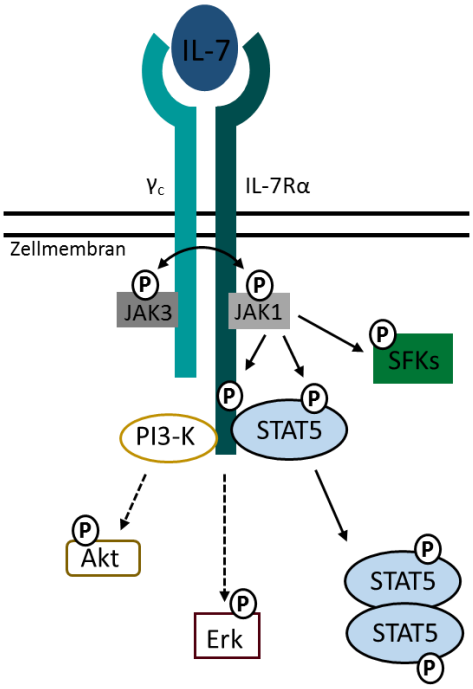


Abb. 6: Signaltransduktion stromabwärts vom IL-7-Rezeptor. Durch Bindung des IL-7-Liganden (IL-7) an der extrazellulären Domäne, werden intrazellulär stromabwärts des Rezeptors mehrere Signalkaskaden aktiviert, die u.a. die Proliferation und das Überleben der Zellen beeinflussen. JAK: Januskinase, SFK: *Src-family kinases*, PI3K: Phosphoinositid-3, Akt: Serin/Threonin-Kinase Akt, Stat5: *signal transducers and activators of transcription* 5, Erk: *Extracellular-signal regulated kinase*. Modifiziert nach (Corfe & Paige, 2012).

2.2.4 Die Rolle des Prä-B-Zellrezeptors in der frühen B-Zellentwicklung

Die frühe B-Zelldifferenzierung ist, wie bereits erwähnt, vor allem durch die geordnete Umlagerung der Gen-Loci gekennzeichnet, die für die schwere und leichte Kette des BZRs kodieren. Dieser als V(D)J-Rekombination bezeichnete Vorgang wird durch die Rag-Proteine, die von den Rekombinations-aktivierenden Genen 1 und 2 (*Rag1* und *Rag2*) kodiert werden, aktiviert. Die Rag-Proteine bilden einen Komplex, welcher Doppelstrangbrüche in der DNA zwischen den Gensegmenten der Immunglobulin-Loci und spezifischen Rekombinationssignalsequenzen (RSS) verursacht (Oettinger et al., 1990). Die geschnittenen DNA-Fragmente werden im Anschluss ungeachtet ihrer Sequenzhomologie wieder miteinander verbunden, was eine zufällige Variation der verschiedenen Gensegmente und damit die Expression einer Vielzahl von unterschiedlichen BZRs zur Folge hat (Lieber et al., 2003).

2.2.4.1 Die Struktur des Prä-BZR im Vergleich zum BZR

Der reife BZR besteht aus einer schweren Kette (IgH) und einer leichten Kette (IgL), die aus mehreren Immunglobulindomänen zusammengesetzt und über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Einzelne Domänen sind dabei unter anderem für die Antigenbindung oder Effektorfunktionen zuständig. Der erste Schritt in der Expression des Prä-BZR bzw. des BZR umfasst die Rekombination der Gensegmente, die für die schwere Kette kodieren. Insgesamt werden drei verschiedene Gensegmente, V (*variability*), D (*diversity*) und J (*joining*) Gene, miteinander verknüpft, wodurch die Variabilität der BZRs entsteht (Berg et al., 2007). Die Rekombination beginnt im Stadium der CLPs mit der Verknüpfung von D_H- und J_H-Segmenten, gefolgt von der Rekombination der DJ_H- und V_H- Fragmente in späteren Pro-B-Zellen. Dabei darf jeweils nur ein Allel der Gen-Loci (für die schwere bzw. die leichte Kette) während der V(D)J-Rekombination umgeordnet werden, um die Antigenspezifität des BZRs für ein spezifisches Antigen aufrechtzuerhalten. Durch monoallelische Aktivierung und gleichzeitige Inhibierung des zweiten Allels nach einem erfolgreichen Rekombinationsprozess wird dieser als allele Exklusion bezeichnete Mechanismus gewährleistet. Nach erfolgreicher Umlagerung der Gene ist die schwere Kette in den frühen Prä-B-Zellen Teil des nur transient exprimierten Prä-B-Zellrezeptors. Dabei bilden zwei schwere Ketten, im Gegensatz zum reifen BZR, zusammen mit zwei vorläufigen leichten Ketten, den sogenannten Ersatz-leichten-Ketten (*surrogate light chain,* SLC), den Prä-BZR. Die SLC ist aus den zwei nicht-variablen Proteinen VpreB und λ5 zusammengesetzt (Abb. 7).

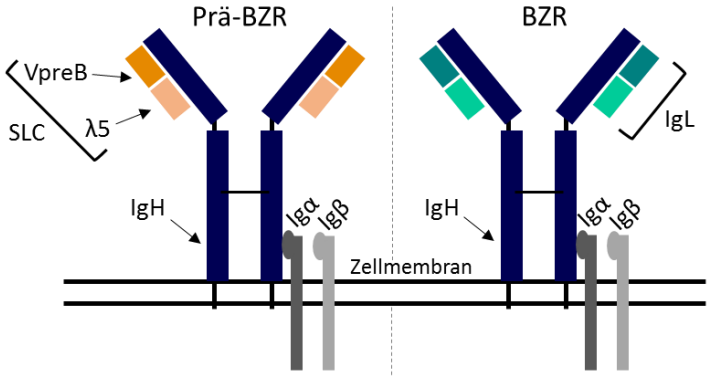


Abb. 7: Struktur des Prä-B- und des B-Zellrezeptors.
Der Prä-B-Zellrezeptor besteht aus der bereits rekombinierten schweren Kette, die mit der SLC komplexiert ist. Der reife B-Zellrezeptor hingegen ist aus der rekombinierten schweren Kette sowie der ebenfalls rekombinierten leichten Kette zusammengesetzt. Die Signaltransduktion beider Rezeptoren erfolgt über die beiden Transmembranproteine Igα und Igβ. SLC: *surrogate light chain*, IgH: Immunglobulin schwere Kette, IgL: Immunglobulin leichte Kette, Igα/β: Immunglobulin assoziertes Transmembranprotein α/β.

Der Prä-BZR sowie der BZR sind zudem mit dem membranständigen Heterodimer aus Igα und Igβ komplexiert, was für die Signaltransduktion durch den Rezeptor unerlässlich ist (Herzog et al., 2009). Igα und Igβ werden von den Genen *CD79a* und *CD79b* kodiert. Ob die Rekombination zur Expression einer funktionalen schweren Kette geführt hat, wird mithilfe der Expression des Prä-BZRs als ersten

Kontrollpunkt während der frühen B-Zelldifferenzierung getestet. Die Kontrollpunktfunktion und die Signaltransduktion des Prä-BZRs werden in den folgenden Abschnitten genauer betrachtet. Bei positiver Selektion der Prä-BZR exprimierenden frühen Prä-B-Zellen und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege erfolgt die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen, die durch Rekombination und Expression der IgL gekennzeichnet ist. Hier werden lediglich zwei Gensegmente, V_L und J_L, miteinander verbunden und der BZR, nun bestehend aus zwei schweren und zwei vollständig rekombinierten leichten Ketten, erstmals auf unreifen B-Zellen exprimiert. Mithilfe eines zweiten Kontrollpunkts wird die erfolgreiche Rekombination der leichten Kette überprüft, sodass die unreifen B-Zellen erst im Anschluss aus dem Knochenmark auswandern und weiter differenzieren können (Melchers et al., 2000). Eine Zusammenfassung der zuvor beschriebenen Prozesse ist in Abbildung 8 zu finden.

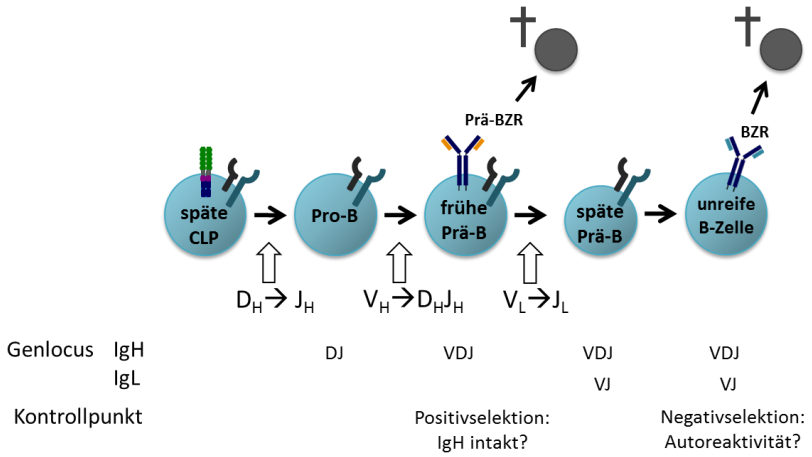


Abb. 8: Übersicht über die Rekombinationsschritte des Immunglobulinlocus während der frühen B-Zellentwicklung.
CLP: allgemeine lymphoide Vorläufer, IgH: Immunglobulin schwere Kette, IgL: Immunglobulin leichte Kette. Abgewandelt nach: (Hardy et al., 2007; Herzog et al., 2009).

2.2.4.2 Die Kontrollpunkt-Funktion des Prä-BZR

Die transiente Expression des Prä-BZR auf den frühen Prä-B-Zellen stellt den ersten wichtigen Kontrollpunkt während der frühen B-Zellentwicklung dar. An diesem Kontrollpunkt wird die erfolgreich rekombinierte schwere Kette auf Funktionalität überprüft, sodass sichergestellt ist, dass nur jene Prä-B-Zellen weiter in der Differenzierung voranschreiten können, die eine Signaltransduktions-kompetente IgH exprimieren. Frühe Prä-B-Zellen, die keine funktionale schwere Kette exprimieren, gehen in Apoptose. Zellen mit einer funktionalen schweren Kette zeigen zunächst eine verstärkte Zellteilung (klonale Expansion), bevor sie in den ruhenden Zustand übergehen. Weiterhin wird die Rekombination der leichten Kette des BZR initiiert und die Differenzierung in späte Prä-B-Zellen gefördert. Die Trennung dieser Proliferations- und Differenzierungsmechanismen wird dabei ebenfalls vom Prä-BZR kontrolliert und reguliert (Clark et al., 2014). Auch der Vorgang der allelen Exklusion (siehe 2.2.4.1) wird an diesem Punkt in der frühen B-Zellentwicklung vom Prä-BZR beeinflusst.

Die Bedeutung dieses Kontrollpunkts wird auch durch verschiedene Mausmodelle, in denen unterschiedliche Komponenten des Prä-BZR-Komplexes mutiert sind, unterstrichen. *μmt*$^{-/-}$ Mäuse können keine membrangebundene schwere Kette exprimieren und zeigen einen Differenzierungsblock im Pro-B-Zellstadium. Vergleichbar dazu können in Mäusen, die kein Igα oder Igβ exprimieren, keine Prä-B-Zellen detektiert werden. Auch ein *knockout* der Komponenten der SLC, VpreB und λ5, beeinträchtigen den Übergang der Vorläuferzellen vom Pro-B- zum Prä-B-Zellstadium und nur wenige reife B-Zellen können in der Peripherie nachgewiesen werden (Herzog et al., 2009). Treten Mutationen in Komponenten des Prä-BZRs oder in wichtigen Signalmolekülen stromabwärts vom Prä-BZR, z.B. im Syk/Blnk-Signalweg auf, kann dies zu einer unkontrollierten Vermehrung der undifferenzierten Vorläuferzellen beitragen und durch weitere Mutationen zur Transformation der Zelle in eine leukämische Zelle und somit zur Entstehung einer Prä-B-zellspezifischen ALL führen. Die Gewährleistung eines funktionalen Prä-BZR-Signalweges an diesem Kontrollpunkt, der die Balance zwischen der Expansion der Vorläuferzellen und der weiteren Differenzierung reguliert, ist folglich für die Entstehung von reifen B-Zellen in der Milz und der Peripherie unerlässlich (Jumaa et al., 2003; Hendriks & Kersseboom, 2006; Rickert, 2013).

2.2.4.3 Der Prä-BZR-Signalweg

Die wichtigsten Wirkmechanismen, die die durch den Prä-BZR vermittelte Signaltransduktion zur Folge hat, wurden bereits im vorherigen Abschnitt zusammengefasst. Im Folgenden soll nun kurz auf molekularer Ebene auf die verschiedenen Signalketten stromabwärts vom Prä-BZR eingegangen werden. Im Gegensatz zur Aktivierung des reifen BZR durch sein spezifisches Antigen, ist die Aktivierung des Prä-BZR noch nicht exakt geklärt. Bekannt ist, dass die Aggregation mehrerer Rezeptoren für die Initiierung der Signalkaskaden nötig ist. Ob dies ein autonomer Prozess ist oder ob zusätzlich die Bindung eines Liganden notwendig ist, wird derzeit noch diskutiert. Fest steht, dass die Zusammenlagerung der Prä-BZRs auf der Zelloberfläche durch den nicht-Immunglobulin-Teil der SLC-Komponente λ5 vermittelt wird (Bankovich et al., 2007; Knoll et al., 2012). Als möglicher Kandidat für einen Liganden des Prä-BZR wird unter anderem Galectin-1 untersucht. Bisherige Studien konnten zeigen, dass Galectin-1 für die Prä-B-Zelldifferenzierung wichtig zu sein scheint und im Knochenmark in Nischen, die die Prä-B-Zelldifferenzierung begünstigen, exprimiert wird (Gauthier et al., 2002; Mourcin et al., 2011).

Die Aktivierung des Prä-BZR resultiert in der Rekrutierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) sowie Mitgliedern der Src-Kinase-Familie, z.B. Lyn. Diese Kinasen phosphorylieren eine Reihe von Signalmolekülen unter anderem spezifische Tyrosinreste in den zytoplasmatischen Domänen von Igα und Igβ (sog. *tyrosine-based activation motifs*, ITAMs), welche wiederum die Autophosphorylierung von Syk und weiteren Src-Kinasen initiieren und so deren Aktivität steigert (Sanchez et al., 1993; Rowley et al., 1995). Syk sowie die Src-Kinasen regulieren dabei

stromabwärts gelegene Signalmoleküle, die sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Vorläuferzellen beeinflussen. Die Proliferation der Prä-B-Zellen wird vor allem durch die Aktivierung des PI3K-Signalweges gesteuert. Hierbei bewirkt die Phosphorylierung des Ko-Rezeptors CD19 die Rekrutierung und Aktivierung der PI3K, was wiederum zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt führt (Deane & Fruman, 2004). Am Ende dieser Signalkaskade wird durch Inhibierung von Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie (*forkhead box O*) unter anderem die Expression der Rag-Proteine inhibiert und gleichzeitig die Proliferation der Zellen durch Inhibierung von Zellzyklus-regulierenden Proteinen gefördert (Coffer & Burgering, 2004; Manning & Cantley, 2007; Herzog et al., 2008). Hier muss erwähnt werden, dass auch der IL-7R über diesen Signalweg die Proliferation der frühen Prä-B-Zellen beeinflusst. Das komplexe Zusammenspiel beider Rezeptoren wird unter 2.2.4.4 näher betrachtet.

Eine weitere durch Syk aktivierte Signalkaskade umfasst die Rekrutierung des Adapterproteins Blnk (auch SLP-65 genannt), die der Proliferation durch den PI3K-Akt-Signalweg entgegenwirkt. Phosphoryliertes Blnk dient als Adapter für Signalmoleküle, die SH2-Domänen aufweisen, wie die Kinase Btk (*Bruton´s tyrosine kinase*) oder die Phospholipase Cγ2 (PLCγ2) (Chiu et al., 2002). Dieser Komplex aus unterschiedlichen Signalmolekülen führt letztendlich zur Expression der Rag-Proteine, die im weiteren Verlauf die Rekombination der leichten Kette des BZRs initiieren sowie zur Expression differenzierungsfördernder Transkriptionsfaktoren wie Irf-4 oder Ikaros und Aiolos, wobei letztere zur Herunterregulation der SLC aufgrund von Inhibition der λ5 Expression beitragen. Die fehlende Expression der SLC-Komponenten stellt dabei einen Schritt zur Beendigung der Prä-BZR-Signaltransduktion dar (Herzog et al., 2009; Heizmann et al., 2013). Es konnte kürzlich jedoch gezeigt werden, dass eine sehr viel umfassendere negative Rückkopplung die Signaltransduktion durch den Prä-BZR beendet und neben den Komponenten der SLC auch viele weitere an der Signalgebung beteiligte Proteine effizient herunter reguliert werden (Hauser et al., 2013). Die wichtigsten Signalwege des Prä-BZR sind in einem vereinfachten Schema in Abbildung 9 zusammengefasst.

Kontrovers diskutiert wird die Frage, wie die Signaltransduktion durch den Prä-BZR zusammen mit dem IL-7R die klonale Expansion der frühen Prä-B-Zellen beeinflusst. Weiterhin ist noch nicht genau geklärt, welche Signalwege stromabwärts vom Prä-BZR den für die weiteren Differenzierungsschritte nötigen Zellzyklusarrest auslösen. Ein möglicher Kandidat ist der Ras/Erk-Signalweg, der ebenfalls durch den IL-7-Rezeptor sowie den Prä-BZR aktiviert wird. Beide Aspekte werden daher im nächsten Abschnitt noch einmal genauer betrachtet.

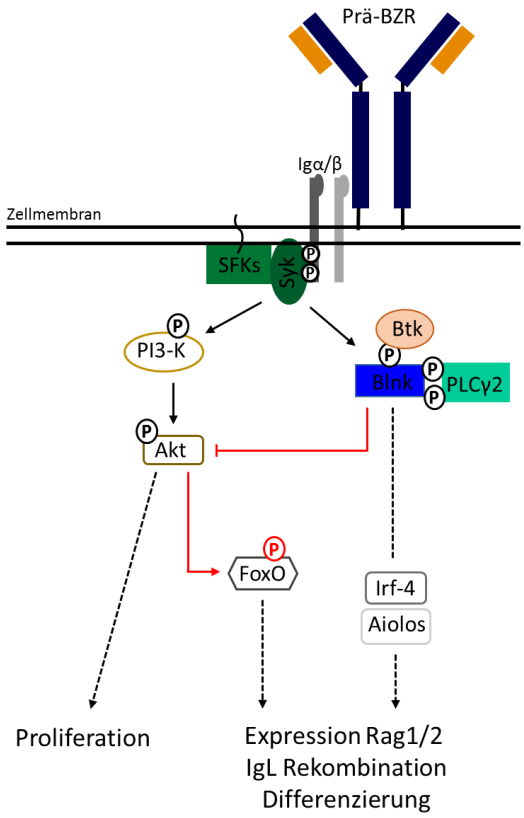


Abb. 9: Übersicht über die Signaltransduktion durch den Prä-BZR. Stromabwärts des Prä-BZRs werden viele Signalwege aktiviert, die zunächst die Proliferation und anschließend die Differenzierung der Vorläuferzellen beeinflussen. Neben dem PI3K-Signalweg, der die Proliferation reguliert, ist die Signalgebung über das Adapaterprotein Blnk für die Differenzierung der Zellen nötig. Igα/β: Immunglobulin-assoziertes Transmembranprotein α/β, PI3K: Phosphoinositid-3 Kinase, Akt: Serin/Threonin Kinase Akt; Blnk: B-Zell Linker Protein, Btk: Burton's Tyrosinkinase, Syk: *spleen tyrosine kinase*, SFK: *Src-family kinase*, Phospholipase C2γ, FoxO: *forkhead box protein* O, Irf-4: Interferon-regulatorischer Faktor 4. Modifiziert nach: (Herzog et al., 2009; Corfe & Paige, 2012).

2.2.4.4 Kooperation von IL-7R und Prä-BZR in frühen Prä-B-Zellen

Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass in Prä-B-Zellen ein komplexer Zusammenhang zwischen der Signaltransduktion durch den IL-7-Rezeptor und den Prä-BZR besteht, der die Proliferation, den Zellzyklusarrest und die weitere Differenzierung dieser frühen Vorläuferzellen steuert. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt. Es werden zwei unterschiedliche Modelle diskutiert, wie der Wechsel zwischen Proliferation und Differenzierung der Prä-B-Zellen reguliert werden könnte. Im ersten Modell ist die Signaltransduktion durch den IL-7-Rezeptor verantwortlich für die klonale Expansion der frühen Prä-B-Zellen und die Herunterregulation dieser Signalwege unabdingbar für den Zellzyklusarrest und die Expression der Rekombinations-aktivierenden Rag-Proteine. Der Prä-BZR und seine nachgeschalteten Signalwege fördern dabei die Differenzierung der Zellen, indem über den Syk/Blnk-Signalweg unter anderem die Expression des Transkriptionsfaktors Irf-4 hochreguliert wird, was die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 verstärkt. Infolgedessen wandern die Zellen aufgrund des zugehörigen Chemokins CXCL12 in Nischen des Knochenmarks, die keine IL-7 exprimierenden Zellen enthalten, sodass der IL-7-Signalweg in den Prä-B-Zellen abgeschaltet wird. Zusätzlich fördert Irf-4 die Differenzierung der Zellen, indem die Rekombination der leichten Kette des BZR aktiviert wird (Johnson et al., 2008).

Das zweite Modell geht davon aus, dass die Signaltransduktion des Prä-BZRs durch einen qualitativen Wechsel charakterisiert ist. Zunächst wird die Proliferation und nach Aktivierung anderer stromabwärts gelegener Signalwege die weitere Differenzierung beeinflusst. Die Proliferation wird dabei zusammen mit dem IL-7-Rezeptor über den PI3K- und den MAPK-Signalweg reguliert. Die Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen wird hingegen wie im oberen Modell durch Signalkaskaden, die über das Adapterprotein Blnk vermittelt werden, aktiviert. Gleichzeitig werden diejenigen Signalkaskaden des Prä-BZRs, die eine Proliferation der Zellen begünstigen, reprimiert (Herzog et al., 2009). Die MAPK Erk scheint dabei je nach Qualität der Prä-BZR-Signaltransduktion die Proliferation der Prä-B-Zellen zusammen mit dem IL-7R zu fördern oder die weitere Differenzierung der Zellen durch Aktivierung des Zellzyklusarrest zu induzieren (Mandal et al., 2009).

Beide Modelle konnten in einer kürzlich veröffentlichen Studie miteinander verknüpft werden (Abb. 10). Laut Ochiai et al. ist zwar die Herunterregulation der IL-7-Signalwege, die hauptsächlich für die Proliferation der Zellen verantwortlich sind, für den Zellzyklusarrest und die Aktivierung der FoxO-Proteine in den frühen Prä-B-Zellen unerlässlich, gleichzeitig führt aber diese Herunterregulation auch zu einem Wechsel der vom Prä-BZR aktivierten Signalkaskaden von Proliferations- zu differenzierungsfördernden Signalwegen. Denn die Aktivierung der FoxO-Proteine induziert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Pax5 die erhöhte Expression von BLNK, wodurch der differenzierungsfördernde Syk-BLNK-Signalweg stromabwärts des Prä-BZR verstärkt aktiviert wird. Die Expressionsrate dieses Adapterproteins ist folglich entscheidend für die Signalgebung des Prä-BZR (Ochiai et al., 2012).

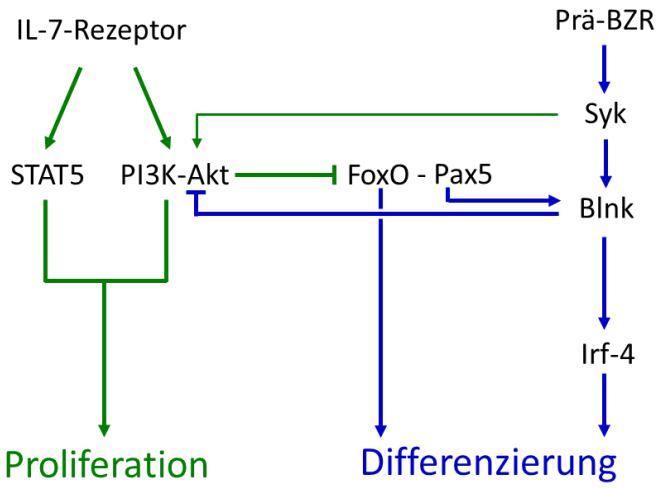


Abb. 10: Zusammenspiel der Interleukin-7- und Prä-B-Zellrezeptor-Signaltransduktion in frühen Prä-B-Zellen.
Dargestellt ist ein stark vereinfachtes Modell der komplexen Wechselwirkung beider Rezeptoren in frühen Prä-B-Zellen. Stromabwärts der Rezeptoren werden jeweils bestimmte Signalwege aktiviert, die sich zum Teil auch gegenseitig bedingen können. So wird in diesen Zellen zunächst die zeitlich limitierte klonale Expansion ermöglicht (über PI3K-Akt sowie STAT5), bevor die proliferationsfördernden Signalkaskaden abgeschaltet werden und Signalwege, die die Differenzierung fördern (über Blnk sowie FoxO), aktiviert werden. Grün: proliferationsfördende Signalwege, blau: Signalkaskaden, die die Differenzierung begünstigen. Abgewandelt nach: (Ochiai et al., 2012; Clark et al., 2014)

2.2.5 Ein Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren beeinflusst die Differenzierung der frühen Vorläuferzellen

In den vorangegangenen Abschnitten ist bereits deutlich geworden, dass eine Gruppe von Signalmolekülen, die Transkriptionsfaktoren (TFs), eine wichtige Rolle in den Signalkaskaden stromabwärts der verschiedenen Rezeptoren spielen. Sie beeinflussen spezifisch die Regulation der Genexpression und somit die Proliferation oder die weitere Differenzierung der Zellen. Auch die Stadien der B-Zelldifferenzierung sind durch die Expression verschiedener Sets an TFs gekennzeichnet, wobei das Wirken der TFs einer komplexen Regulation unterliegt.

2.2.5.1 Funktion und Regulation von Transkriptionsfaktoren

Um die Expression spezifischer Gene zu steuern, binden Transkriptionsfaktoren (*trans*-regulatorische Elemente) an sogenannte *cis*-regulatorische Elemente der DNA. Diese *cis*-regulatorischen Elemente umfassen DNA-Bereiche wie Promotoren, *Enhancer* oder *Silencer*. Promotoren sind durch bestimmte DNA-Sequenzen, wie der TATA-Box und der Initiatorsequenz, gekennzeichnet und liegen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (*transcriptional start site*, TSS). Sie dienen als Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II und werden als Kernpromotoren bezeichnet. Die Initiation der Transkription durch die Bindung der allgemeinen TFs an den Kernpromotor ist allerdings relativ schwach. Durch Bindung von sequenzspezifischen TFs an proximale Promotorregionen kann die transkriptionelle Aktivität jedoch verstärkt werden, da dies zu einer Stabilisierung der Bindung der allgemeinen TFs an den Kernpromotor oder zur Rekrutierung weiterer TFs führt. Die Transkriptionsfaktoren erkennen dabei kurze, 6-12 bp lange spezifische DNA-Sequenzen, auch Motive genannt. Darüber hinaus kann die Bindung weiterer TFs an sogenannte *Enhancer*-Regionen die Transkription beeinflussen. *Enhancer* sind regulatorische Bereiche in der DNA, die ebenfalls sequenzspezifische Bindungsstellen für TFs aufweisen, jedoch weit entfernt von der TSS stromauf- oder abwärts des Gens liegen können. Die Bindung der TFs und weiterer Ko-Faktoren an *Enhancer*-Elemente führt dabei zum sogenannten *Looping* der DNA, also einer Konformationsänderung, bei der Promotor- und *Enhancer*-Bereich in räumliche Nähe gebracht werden. Hierdurch kann die Stabilisierung des RNA-Polymerase-Komplexes sowie die Rekrutierung weiterer Ko-Faktoren, wie Histon-modifizierenden Enzymen, begünstigt und so die Transkription direkt beeinflusst werden. Demgegenüber können *Silencer*-Elemente die Transkription negativ beeinflussen und liegen wie die *Enhancer*-Elemente weit von der Promotorregion entfernt. Die Bindung spezifischer TFs, in diesem Zusammenhang Repressoren genannt, hemmt hierbei die Transkription, indem durch Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen wie Histon-Deacetylasen die Kondensation des Chromatins gefördert wird (Farnham, 2009; Bulger & Groudine, 2011).

Wie bereits angedeutet, hängt die transkriptionelle Aktivität eines DNA-Bereichs stark von der Struktur des Chromatins ab, die einerseits die Bindung der TFs selbst beeinflusst, andererseits auch nach Bindung der TFs die Struktur des Chromatins anderer DNA-Abschnitte und damit deren Transkription regulieren kann. Die vererbbare Regulation der Genexpression durch Modifizierungen des Chromatins bzw. der Histone und der DNA - ohne die DNA-Sequenz dabei zu verändern - wird als Epigenetik bezeichnet. Das epigenetische Profil einer Vorläuferzelle, z.B. während der Hämatopoese, kann so deren Differenzierungspotential mitbestimmen (zusammengefasst in: (Cedar & Bergman, 2011)). Histone z.B. können unterschiedliche Modifizierungen aufweisen, die die transkriptionelle Aktivität eines *cis*-Elements positiv oder negativ beeinflussen. So sind aktive Promotorregionen unter anderem durch Tri-Methylierungen des Lysins 4 in Histon 3 (H3K4me3) markiert, während aktive *Enhancer* Mono-Methylierungen desselben Lysins (H3K4me1) aufweisen. Zusätzlich können bestimmte Aminosäurereste der Histone auch acetyliert werden, was die Transkription ebenfalls positiv beeinflusst. Durch die zuvor genannten Modifizierungen wird die Histonstruktur gelockert und TFs sowie weitere Ko-Faktoren können an die DNA binden. Reprimierte regulatorische Regionen hingegen sind durch Methylierungen der Lysine 9 und 27 in Histon 3 (H3K9me bzw. H3K27me) gekennzeichnet, was mit einer stärkeren Kondensierung des Chromatins einhergeht. Vermittelt werden diese Reaktionen durch verschiedene Histon-modifizierende Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen (HATs) sowie Histon-Methyltransferasen (HMTs) und deren Gegenspieler Histon-Deacetylasen (HDACs) sowie Histon-Demethylasen (KDMs) (Choukrallah & Matthias, 2014).

Um die Expression nur spezifischer Gene in verschiedenen Zelltypen zu garantieren, muss die Aktivität der Transkriptionsfaktoren genauestens reguliert werden. Neben der Regulation durch die sich verändernde Chromatinstruktur müssen folglich auch noch weitere Mechanismen, die die Bindung von TFs an die DNA steuern, vorliegen. So beeinflussen posttranslationale Modifizierungen der TFs, die Phosphorylierungen, SUMOrylierungen und Ubiqutinierungen umfassen können, die Aktivität sowie Stabilität der TFs und damit auch die Bindung an die DNA. Auch die Konzentration der einzelnen Faktoren in der Zelle und die Anzahl der Bindungsstellen in einem *cis*-regulatorischen Element zeigt eine Auswirkung auf die spezifische Genexpression. Vor allem scheint jedoch aber das komplexe Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren die Expression zellspezifischer Gene zu bestimmen. Direkte Protein-Protein-Interkationen beeinflussen dabei die jeweiligen Bindungsaffinitäten der beteiligten Faktoren und können so die transkriptionelle Aktivität regulieren. Dieser Mechanismus wird als kooperative Bindung bezeichnet und kann auch ohne die direkte Interaktion zweier oder mehrerer Faktoren die Bindungsaffinität der TFs beeinflussen und damit die Transkription aktivieren oder reprimieren. So kann z.B. die Bindung eines TFs die lokale Chromatinstruktur verändern und so die Bindung eines weiteren TFs beeinflussen oder die Bindungsaffinitäten von zwei voneinander entfernt liegenden TFs können durch die gemeinsame

Rekrutierung eines weiteren Ko-Faktors erhöht werden. Da zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle jeweils verschiedene TFs und Ko-Faktoren exprimiert werden, wird abhängig davon auch nur ein spezifisches Repertoire an Zielgenen reguliert und so zur spezifischen Aktivität eines TFs beigetragen (Spitz & Furlong, 2012). So sind auch die verschiedenen Differenzierungsstadien während der frühen B-Zellentwicklung durch das Zusammenspiel verschiedener TFs charakterisiert und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

2.2.5.2 Multipotente Progenitorzellen: lymphoide vs. myeloide Entwicklung

Im hierarchischen Prozess der Hämatopoese ist der erste Schritt in Richtung einer lymphoiden Entwicklung die Differenzierung von MPPs zu LMPPs und weiter in die lymphoid restringierten CLPs. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die zu dieser Linienspezifikation beitragen, sind der zur ETS (*E26 transformation-specific*)-Familie gehörende Faktor PU.1 sowie der Zinkfingertranskriptionsfaktor Ikaros, kodiert durch die Gene *Sfpi1* bzw. *Ikzf1*.

PU.1

Dass PU.1 eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielt, wird durch Analysen von Mäusen, die eine Deletion von *Sfpi1* in der Keimbahn aufweisen, deutlich. Diese Mäuse sterben bereits während der Embryogenese und zeigen einen frühen Block in der myeloiden und lymphoiden Differenzierung, wobei bezogen auf die lymphoide Linie weder B- noch T-Zellen identifiziert werden konnten (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996). Dabei reguliert PU.1 viele Gene, die eine myeloide oder lymphoide Differenzierung begünstigen. Ohne Aktivierung durch PU.1 ist z.B. die Expression von Genen, die für myeloide Zytokinrezeptoren kodieren, stark reduziert. In der lymphoiden Entwicklung hingegen aktiviert PU.1 die Expression der α-Kette des IL-7Rs und trägt so zur lymphoiden Differenzierung bei (DeKoter et al., 1998; DeKoter et al., 2002). Die zelltypspezifischen Funktionen von PU.1 scheinen dabei zum Teil durch kollaborative Interaktionen mit anderen linienspezifischen TFs gewährleistet zu werden (Heinz et al., 2010). Bestimmte Populationen der myeloiden Linie sind dabei durch eine hohe PU.1-Expression gekennzeichnet, während die Expression in Zellen der B- und T-Zelldifferenzierung deutlich niedriger ist (DeKoter & Singh, 2000; Nutt et al., 2005). Welche Faktoren diese dynamische Expression von PU.1 hierbei regulieren, ist noch nicht bekannt. Die genauere Untersuchung der Funktionen von PU.1 in konditionalen *knockout* Mausmodellen, in denen *Sfpi1* erst in bereits B-Zell-restringierten Vorläufern deletiert wurde, konnte zudem zeigen, dass PU.1 für die weitere Differenzierung nicht mehr essentiell ist und reife B-Zellen entstehen können. Darüber hinaus konnte in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden, dass auch eine Deletion von *Sfpi1* im früheren Entwicklungsstadium der CLPs ebenfalls keine Auswirkung auf die weitere B-Zelldifferenzierung hat (Iwasaki et al., 2005; Polli et al., 2005; Ye et al., 2005). Folglich ist PU.1 ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der noch frühen multipotenten Vorläuferzellen und deren lymphoide Spezifikation, nicht aber für die spätere B-Zelldifferenzierung essentiell.

Ikaros

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung der lymphoiden Linie beeinflusst, ist Ikaros, zu dessen Subfamilie unter anderem auch die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Helios gehören, die ebenfalls in Zellen des hämatopetischen Systems exprimiert werden. Ikaros ist in der adulten Hämatopoese vor allem in Zellen der lymphoiden Linie exprimiert, jedoch auch in der myeloiden Linie und den HSZs sowie in den multipotenten Vorläufern (John & Ward, 2011). Aufgrund der Analyse verschiedener Mausmodelle, in denen kein funktionales Ikaros exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung in die lymphoide Linie blockiert ist und keine CLPs detektiert werden können (Georgopoulos et al., 1994; Wang et al., 1996). Neuere Untersuchungen ergaben zudem, dass die ersten lymphoid geprägten Vorläuferzellen (LMPPs) noch entstehen können, jedoch keine weitere Differenzierung in lymphoid restringierte CLPs stattfindet (Yoshida et al., 2006). Des Weiteren scheint Ikaros bereits in den hämatopoetischen Stammzellen das Transkriptionsprogramm in Richtung der lymphoiden Linie zu fördern, während in den multipotenten Vorläuferzellen Gene, die die Selbsterneuerung und Multipotenz aufrecht erhalten würden, durch Ikaros reprimiert werden (Ng et al., 2009). Ikaros kann also sowohl als Aktivator als auch als Repressor für die Transkription spezifischer Gene wirken, indem Ikaros unter anderem an der Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Komplexen beteiligt ist (Kim et al., 1999). Ikaros ist neben PU.1 also ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung der frühen lymphoiden Vorläufer beeinflusst, wobei angenommen wird, dass beide Faktoren unabhängig voneinander diese Differenzierungsschritte regulieren (Matthias & Rolink, 2005). Durch *in vitro* Analysen und Entwicklung von konditionellen *Ikzf1*$^{-/-}$ Mausmodellen konnte zudem in den letzten Jahren die Rolle von Ikaros in den bereits spezifizierten B-Zellvorläufern untersucht werden. Demnach ist Ikaros für die Differenzierung in späte Prä-B-Zellen unerlässlich, da Ikaros eine Reihe von Signalmolekülen stromabwärts des Prä-BZRs reguliert. Gleichzeitig wird die Expression von myeloiden Genen reprimiert (Thompson et al., 2007; Reynaud et al., 2008; Ferreiros-Vidal et al., 2013; Heizmann et al., 2013). Des Weiteren beeinflusst Ikaros durch Aktivierung und Repression bestimmter Zielgene die Adhäsion und Migration der Prä-B-Zellpopulationen. Dabei ist letztere unerlässlich für die Wanderung der Zellen in Nischen des Knochenmarks mit geringer IL-7-Konzentration, um die Proliferation der Zellen zu beenden und die weitere Differenzierung zu fördern. Die Regulation verschiedener Zielgene in frühen lymphoiden Vorläufern sowie in Pro-B- und Prä-B-Populationen kann durch unterschiedliche Bindung an bestimmte *cis*-Elemente in der DNA oder auch durch Kooperation mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren erklärt werden (Joshi et al., 2014; Schwickert et al., 2014).

2.2.5.3 Frühe B-Zellvorläufer: B-Zellspezifikation und Reifung

Für die Differenzierung der allgemeinen lymphoiden Vorläufer in B-Zell-restringierte Progenitoren ist ein Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren verantwortlich, das als Hauptkomponenten die Faktoren E2A, Ebf1 und Pax5 aufweist. Aber auch weitere Transkriptionsfaktoren wie HEB und Foxo1 sind an diesem Differenzierungsschritt beteiligt.

E2A/HEB

E2A und HEB gehören zur *basic-helix-loop-helix* (bHLH)-Genfamilie der E-Box-Proteine und werden durch die Gene *Tcfe2a* bzw. *Tfc12* kodiert. Die B-Zelldifferenzierung in Mäusen, die kein E2A exprimieren, ist im späten CLP-Stadium beim Übergang zu Pro-B-Zellen blockiert, da die für die Differenzierung essentiellen Gene, die für die B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Ebf1 und Pax5 kodieren, nicht hochreguliert werden. Des Weiteren kann in diesen Mäusen keine IgH-Rekombination aufgrund der fehlenden Expression von *Rag1* detektiert werden (Bain et al., 1994; Seet et al., 2004). Zusammen mit dem E-Box-Protein HEB aktiviert E2A außerdem den in der weiteren B-Zelldifferenzierung ebenfalls wichtigen Transkriptionsfaktor Foxo1 (Welinder et al., 2011). Die aufgrund von E2A-Aktivierung exprimierten Transkriptionsfaktoren Ebf1 und Foxo1 regulieren im weiteren Verlauf der Differenzierung zusammen mit E2A die Expression nachgeschalteter Zielgene wie *Pax5* und beeinflussen so die B-Zellspezifikation der frühen Vorläuferzellen (Lin et al., 2010). Analysen in konditionellen *Tcfe2a*$^{-/-}$ Mäusen haben zudem gezeigt, dass E2A nicht nur das B-zellspezifische Transkriptionsprogramm aktiviert, sondern dieses in den weiteren Vorläuferstadien aufrechterhält (Kwon et al., 2008).

Ebf1

Ein weiterer kritischer Transkriptionsfaktor, der die B-Zellspezifikation gewährleistet, ist Ebf1 (*early B-cell factor 1*) und gehört zur Familie der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Die fehlende Expression von Ebf1 führt ebenfalls zu einem Block in der B-Zelldifferenzierung noch bevor die IgH-Rekombination aktiviert werden kann (Lin & Grosschedl, 1995). Dabei reguliert Ebf1 eine Reihe wichtiger B-zellspezifischer Gene (*Igα*, *Vpreb*, *Igll1*, *Pax5* und *Foxo1*) und reprimiert gleichzeitig Gene, die eine myeloide oder T-zellspezifische Differenzierung fördern würden, sodass die Expression von Ebf1 auch in späteren B-Zell-restringierten Vorläufern für die weitere Reifung der Zellen unerlässlich ist (Zandi et al., 2008; Vilagos et al., 2012; Nechanitzky et al., 2013). Ebf1 aktiviert jedoch nicht nur die Expression der B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Foxo1 und Pax5, sondern reguliert zusammen mit diesen Faktoren weitere gemeinsame Zielgene. Gleichzeitig verstärken beide Faktoren in einer positiven Rückkopplungsschleife auch die Expression von Ebf1 selbst, was wiederum die Differenzierung in B-zellspezifische Vorläufer positiv beeinflusst (Roessler et al., 2007; Mansson et al., 2012). Die Überexpression von Ebf1 in E2A-, PU.1- sowie Ikaros-defizienten Mäusen kann zudem die in diesen Mausmodellen identifizierten Blockaden in der B-Zelldifferenzierung teilweise aufheben, was

die zentrale Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Entwicklung von funktionalen B-Zellen unterstreicht (Medina et al., 2004; Seet et al., 2004; Reynaud et al., 2008).

Foxo1

Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, spielt auch der Transkriptionsfaktor Foxo1, der zur *Forkhead box O*-Familie gehört, eine wichtige Rolle während der B-Zellentwicklung. *Foxo1*$^{-/-}$ Mäuse zeigen einen Block in den späten CLPs, infolgedessen keine reifen B-Zellen entstehen können (Mansson et al., 2012). Durch Deletion von *Foxo1* in verschiedenen Stadien der B-Zelldifferenzierung konnte zudem gezeigt werden, dass Foxo1 sowohl in den frühen Vorläuferzellen, als auch in den reifen B-Zellen die Differenzierung und Funktion der Zellen beeinflusst. So sind die Expressionslevel der Gene, die für die α-Kette des IL-7-Rezeptors sowie für die Rag-Proteine kodieren, in Pro-B- bzw. in den Prä-B-Zellen reduziert (Dengler et al., 2008). Dies geht einher mit der Beobachtung, dass Foxo1 zusammen mit weiteren Schlüsseltranskriptionsfaktoren der frühen B-Zellentwicklung eine Reihe von B-zellspezifischen Zielgenen reguliert. So konnte unter anderen gezeigt werden, dass Foxo1 zusammen mit Pax5 und anderen TFs stromabwärts des Prä-BZRs die Differenzierung in späte Prä-B-Zellen fördert (Lin et al., 2010; Ochiai et al., 2012).

Pax5

Aktiviert durch die Transkriptionsfaktoren E2A und Ebf1, ist die Expression von Pax5 nicht für die B-Zellspezifikation, sondern für die Erhaltung der frühen Vorläufer-B-Zellen und deren Differenzierung notwendig. Daher erfolgt die Expression von Pax5 erst ab dem Pro-B-Zellstadium und wird in den reifen Plasmazellen herunter reguliert (Fuxa & Busslinger, 2007). Anhand von verschiedenen *knockout* Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Pax5 die B-Zelldifferenzierung stabilisiert, indem B-zellspezifische Gene aktiviert und die Gene anderer hämatopoetischer Linien reprimiert werden (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999; Mikkola et al., 2002). Dabei scheint Pax5 in den Vorläuferpopulationen und in reifen B-Zellen jeweils ein spezifisches Repertoire an Zielgenen zu regulieren. In frühen Vorläufern werden unter anderem Gene, die für die Signaltransduktion durch den Prä-BZR wichtig sind, aktiviert. Hervorzuheben ist, dass Pax5 ebenfalls die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (Irf-4, Irf-8, Spi-B, Aiolos) die für die weitere Prä-B-Zelldifferenzierung essentiell sind, aktiviert und somit einen der Schlüsseltranskriptionsfaktoren in diesem Stadium der B-Zelldifferenzierung darstellt (Schebesta et al., 2007; Revilla et al., 2012).

2.2.5.4 Prä-B-Zellvorläufer: Weitere Differenzierung zu unreifen B-Zellen

Neben den oben beschriebenen Schlüsseltranskriptionsfaktoren gibt es eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die vor allem die Entwicklung der Prä-B-Zellpopulation hin zu unreifen B-Zellen beeinflussen. Über das komplexe Netzwerk dieser Faktoren stromabwärts des Prä-BZRs und deren gegenseitige Regulation ist jedoch bisher nicht viel bekannt. Irf-4 (*Interferon regulatory factor*) sowie

Irf-8 gehören zur Irf-Familie der Transkriptionsfaktoren und sind durch eine starke Homologie gekennzeichnet, sodass redundante Funktionen für beide TFs angenommen werden. Dabei binden Irf-4 und Irf-8 nur mit geringer Affinität an die DNA und werden daher vielmehr durch andere TFs wie z.B. PU.1 und Spi-B zu den spezifischen Bindungsstellen rekrutiert (Pang et al., 2014). Anhand von Irf-4 und Irf-8 defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Expression beider Faktoren zu einer Differenzierungsblockade in den frühen Prä-B-Zellen führt, die durch starke Proliferation und durch die dauerhafte Expression eines Prä-BZR gekennzeichnet sind. Zudem ist in diesen Zellen aufgrund fehlender Differenzierungssignale durch den Prä-BZR auch keine Rekombination der leichten Kette des BZR zu detektieren (Lu et al., 2003). Auch für die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B gibt es erste Hinweise, dass sie eine regulatorische Rolle stromabwärts des Prä-BZRs einnehmen. Werden weder Spi-B noch sein naher Verwandter PU.1 exprimiert, führt dies im Mausmodell zu einem Block in der B-Zellentwicklung im Prä-B-Zellstadium und zur Entstehung einer Prä-B-ALL, wobei die weitere Differenzierung stromabwärts des Prä-BZRs gestört ist (Sokalski et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor Aiolos hingegen reprimiert die Expression von λ5 und beeinflusst so das Abschalten der Prä-BZR-Signaltransduktion und die weitere Differenzierung in späte Prä-B-Zellen (Thompson et al., 2007).

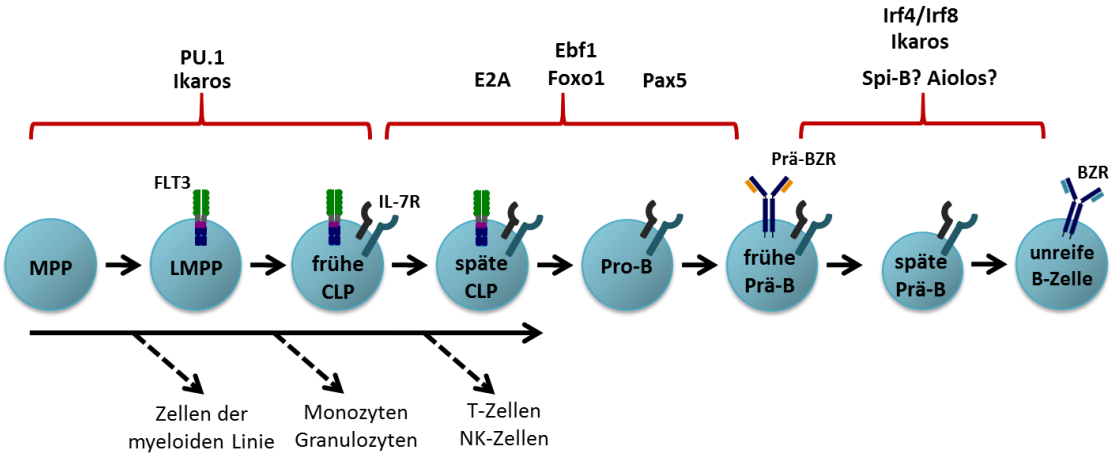


Abb. 11: Übersicht über die wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der frühen B-Zelldifferenzierung.
Dargestellt sind die verschiedenen Entwicklungsstadien von der multipotenten Vorläuferzelle bis zur unreifen B-Zelle. Die roten Klammern markieren die Stadien der Vorläuferzellen, in denen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren einen besonders starken Einfluss auf die weitere Differenzierung der Zellen ausüben. MPP: multipotenter Progenitor, LMPP: lymphoid-polarisierte multipotente Vorläuferzelle, CLP: gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle.

Interessanterweise sind in den meisten Leukämien unter anderem Mutationen in den oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren zu finden. Diese Mutationen führen dabei häufig zu einem Funktionsverlust der betroffenen Transkriptionsfaktoren, was die Deregulation der Zielgene zur Folge hat. Dementsprechend sind Leukämien dadurch gekennzeichnet, dass aufgrund von genetischen Veränderungen in den Zellen die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung nicht mehr gewährleistet werden kann, weitere Mutationen akkumulieren und nur noch wenig ausdifferenzierte

Blutzellen entstehen können. Vielmehr werden das Immunsystem und die zugehörigen Organe mit funktionslosen Vorläuferzellen überschwemmt. Sind dabei die Zellen in der lymphoiden Linie betroffen, wird von einer akuten lymphoiden Leukämie (ALL) gesprochen (Hamerschlak, 2008). Bezogen auf die Transkriptionsfaktoren konnte gezeigt werden, dass in über 40% aller Progenitor-B-ALLs Mutationen in Genen, die für TFs kodieren, zu finden sind. *PAX5*, *IKAROS*, *EBF1* und *E2A* weisen dabei vor allem Deletionen und Punktmutationen in den kodierenden Bereichen auf (Mullighan et al., 2007). Des Weiteren sind verschiedene chromosomale Translokationen mit bestimmten Subtypen von Progenitor-B-ALLs assoziiert. Als eines der am häufigsten von chromosomalen Aberrationen betroffenen Gene ist *RUNX1* zu nennen, dessen Genprodukt ebenfalls einen Schlüsseltranskriptionsfaktor in der Hämatopoese darstellt und daher im nächsten Abschnitt näher betrachtet werden soll.

2.3 Der Transkriptionsfaktor Runx1

2.3.1 Runx-Proteine und deren Struktur

Der Transkriptionsfaktor Runx1 (auch AML1, Cbfα oder PEBP2α) gehört zur Familie der *core binding factors* (CBFs), die in Säugern aus insgesamt drei DNA-bindenden α-Untereinheiten (Runx1, Runx2, Runx3) und einer nicht-DNA bindenden β-Untereinheit (Cbfβ) besteht. Dabei bilden jeweils eine der α-Untereinheiten zusammen mit Cbfβ einen heterodimeren Transkriptionsfaktor. Entdeckt wurden die CBFs ursprünglich aufgrund der Interaktionen mit spezifischen *Enhancer*-Elementen im Moloney murinen Leukämievirus (*core binding factor* α, Cbfα) und im Polyomavirus (*polyomavirus enhancer-binding protein* 2α, PEBP2α) (Ito, 2004). Alle drei α-Untereinheiten sind hoch konserviert und weisen daher große strukturelle Ähnlichkeiten auf, sind jedoch durch nicht-redundante Funktionen gekennzeichnet. Runx1 spielt vor allem in Zellen des hämatopoetischen Systems eine Rolle, während Runx2 für die Knochenbildung wichtig ist. Runx3 hingegen ist unter anderem an der neuronalen Entwicklung sowie an der T-Zelldifferenzierung beteiligt (Chuang et al., 2013). Bezogen auf die nicht-redundanten Funktionen der Runx-Faktoren konnte in humanen reifen B-Zellen gezeigt werden, dass die Repression von RUNX1 durch RUNX3 ein kritischer Schritt für die Aktivierung von naiven B-Zellen darstellt. Auch in der T-Zellentwicklung sind die verschiedenen Runx-Proteine an unterschiedlichen Differenzierungsschritten beteiligt (de Bruijn & Speck, 2004; Brady & Farrell, 2009). Die Expression von Runx1 wird dabei von zwei unterschiedlichen Promotoren, P1 und P2, gesteuert, was zusammen mit dem Mechanismus des alternativen *Spleißen* zur Entstehung unterschiedlicher Isoformen von Runx1 beiträgt. Dabei scheint die Aktivität der Promotoren und somit auch die Expression spezifischer Runx1-Transkripte während der embryonalen und adulten Hämatopoese genauestens reguliert zu sein (Miyoshi et al., 1995; Ghozi et al., 1996; Pozner et al., 2007).

Allen Runx-Proteinen gemein ist die am N-Terminus lokalisierte hoch konservierte Runt-Domäne, die aus 128 Aminosäuren besteht und die DNA-Bindung an die spezifische Konsensussequenz PyGGTPy vermittelt. Die Domäne weist eine starke Homologie zum Gen *runt* von *Drosophila melanogaster* auf und ist auch in anderen Spezies hoch konserviert (Melnikova et al., 1993; Ogawa et al., 1993; Rennert et al., 2003). Neben der DNA-Bindung ist die Runt-Domäne auch für die Heterodimerisierung mit Cbfβ verantwortlich, wodurch zum einen die DNA-Bindungsaffinität des Heterodimers verstärkt und zum anderen Runx1 vor proteolytischem Abbau geschützt wird (Ogawa et al., 1993; Huang et al., 2001). Die C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne ist durch eine Reihe von Bindungsstellen für aktivierende Ko-Faktoren wie die Histonacetyltransferasen MOZ und p300 charakterisiert. Des Weiteren sind C-terminal von der Runt-Domäne und der Aktivierungsdomäne auch Domänen, an die Repressoren binden können, lokalisiert. Ein Teil der bereits bekannten Interaktionspartner von Runx1 sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen für unterschiedliche Interaktionspartner macht deutlich, dass die Aktivität und spezifische Funktion von Runx1 einer komplexen Regulation unterliegt (zusammengefasst in: (Ito, 1999; Chuang et al., 2013)).

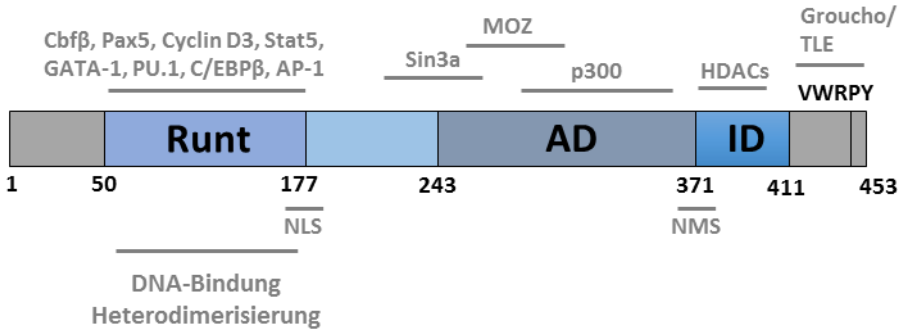


Abb. 12: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Runx1 und interagierende Kofaktoren. Runx1 weist N-terminal eine DNA-Bindungsdomäne auf, die Runt-Domäne, die zusätzlich auch die Heterodimerisierung mit dem Kofaktor Cbfβ vermittelt. C-terminal sind die Transaktivierungsdomäne (AD) sowie eine inhibitorische Domäne (ID) und das VWRPY-Motiv lokalisiert. Die Region des Kernlokalisationssignals (NLS) sowie des nukleären Matrixsignals (NMS) sind angegeben. Außerdem sind die Interaktionsflächen der diversen Kofaktoren dargestellt.

2.3.2 Die Rolle von Runx1 in der Leukämogenese

RUNX1 ist eines der am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene in akuten Leukämien. Solche Mutationen umfassen Translokationen, aber auch inaktivierende Mutationen und Deletionen im Genlocus für *RUNX1* (Blyth et al., 2005). Translokationen treten dabei am häufigsten auf und sind mit bestimmten Subtypen der Leukämie assoziiert. Die chromosomale Translokation t(8;21) fusioniert die N-terminale DNA-Bindungsdomäne von RUNX1 mit dem nahezu gesamten ETO-Protein und ist in 40% der akuten myeloiden Leukämien (AML) mit einem Subtyp M2 zu finden. Dabei führt die Expression des Fusionsproteins zu einer dominant-negativen Inhibierung der RUNX1-Zielgene, gleichzeitig können aber auch andere Gene spezifisch durch RUNX1-ETO transaktiviert werden.

(Peterson & Zhang, 2004). Eine weitere Mutation beinhaltet die chromosomale Translokation t(12;21), die zur Expression des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 führt (Abb. 13). Im Gegensatz zu anderen RUNX1-Fusionsproteinen ist hier fast das gesamte RUNX1-Protein und nicht nur die N-terminal gelegene Runx1-Domäne mit dem N-terminalen Ende des ETV6-Transkriptionsfaktors fusioniert. ETV6-RUNX1 ist in 25% aller akuten lymphoiden Leukämien zu detektieren, die einen Differenzierungsblock im Prä-B-Zellstadium aufweisen. Ebenso wie für RUNX1-ETO konnte auch für das ETV6-RUNX1 Fusionsprotein eine dominant-negative Inhibierung der RUNX1-Zielgene gezeigt werden. Dabei wird angenommen, dass die ETV6-Domänen die Multimerisierung des Fusionsproteins oder die Rekrutierung von Ko-Repressorkomplexen bewirken, sodass keine DNA-Bindung und Transkription der Zielgene mehr möglich ist (Zelent et al., 2004; Niebuhr et al., 2008). In neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass ETV6-RUNX1 auch eine Reihe von Promotorregionen bindet, die normalerweise nicht durch RUNX1 besetzt sind. Zudem werden durch die ETV6-RUNX1 vermittelte Aktivierung bestimmter Gene auch gezielt Signalwege dereguliert, die die Selbsterneuerungskapazität oder Proliferation der Zellen steuern (Fuka et al., 2011; Linka et al., 2013). Auch Punktmutationen sind mit bestimmten Leukämie-Subtypen verknüpft. Diese dominant-negativen oder inaktivierenden Mutationen sind unter anderem in 15-25% aller AMLs zu finden und meist in Regionen der Runt-Domäne lokalisiert, die die DNA-Bindung oder Dimerisierung mit Cbfβ vermitteln. Für alle zuvor beschriebenen Mutationen gilt dabei, dass eine Mutation nicht ausreichend ist, um die Transformation in eine leukämische Zelle zu bewirken. Stattdessen wird die Zelle in einen prä-leukämischen Zustand versetzt, wobei erst durch sekundäre Mutationen die volle Transformation der Zelle initiiert wird (Blyth et al., 2005; Niebuhr et al., 2008).

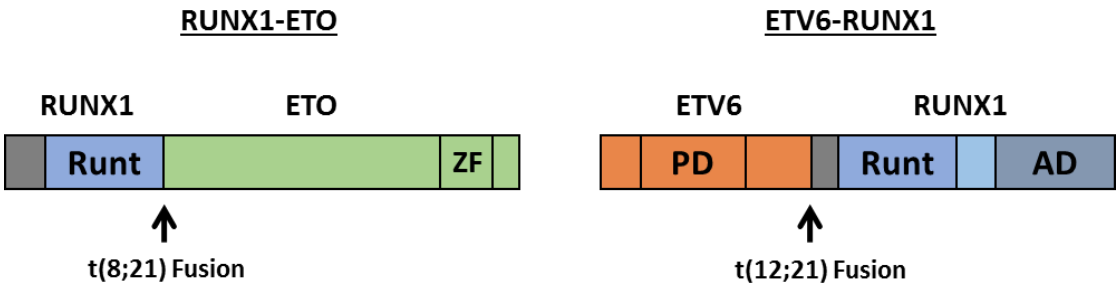


Abb. 13: Domänenstruktur der Fusionsproteine RUNX1-ETO sowie ETV6-RUNX1.
Während bei der Fusion t(12;21) fast das gesamte RUNX1-Protein mit dem N-terminalen Ende des ETV6-Transkriptionsfaktors verknüpft ist, weist das Fusionsprotein RUNX1-ETO nur die N-terminale DNA-Bindungsdomäne von RUNX1 auf. ZF: Zinkfinger, PD: *oligomerisation pointed domain*, AD: Transaktivierungsdomäne. Abgewandelt nach: (Speck & Gilliland, 2002).

2.3.3 Runx1 in der murinen Hämatopoese

Die Bedeutung von Runx1 für die Hämatopoese konnte bereits anhand unterschiedlicher Mausmodelle ermittelt werden. Ein Verlust der Runx1-Expression resultiert in einem pränatal letalen Phänotyp der Mäuse an E12.5, wobei keine hämatopoetischen Zellen in der fetalen Leber und damit

auch keine adulte Hämatopoese detektiert werden kann. Folglich ist die Aktivität von Runx1 für die Entwicklung adulter hämatopoetischer Stammzellen aus den embryonalen Vorläufern unerlässlich, danach jedoch ist Runx1 für das Überleben dieser Zellpopulation nicht weiter essentiell (Okuda et al., 1996; Chen et al., 2009). Wird die Expression von Runx1 betrachtet, ist der Transkriptionsfaktor in der adulten Hämatopoese, abgesehen von Erythrozyten, in allen Zellen des blutbildenden Systems exprimiert (Lorsbach et al., 2004). Weiterhin wurde die Bedeutung von Runx1 für die adulte Hämatopoese durch die Analyse verschiedener Mausmodelle untersucht, in denen *Runx1* erst in adulten hämatopetischen Zellen deletiert ist. So ist in diesen Mäusen in fast allen Linien des blutbildenden Systems eine Auswirkung der fehlenden Runx1-Expression zu detektieren. Eine Blockade der Differenzierung ist in B- und T-Zellen zu finden sowie auch in der Differenzierung der Megakaryozyten. Außerdem ist der Phänotyp dieser Mäuse durch eine Expansion der Stammzellpopulation und der myeloiden Vorläufer gekennzeichnet (Ichikawa et al., 2004; Growney et al., 2005; Putz et al., 2006; Ichikawa et al., 2008). Bei genauerer Betrachtung des Defekts in der B-Zelldifferenzierung konnte anhand eines weiteren konditionalen *Runx1 knockout* Mausmodells gezeigt werden, dass die Expression von Runx1 für die Differenzierung der frühen lymphoiden Progenitoren in B-zellspezifische Vorläufer wichtig ist. Hierbei unterstützt und „katalysiert“ Runx1 ein Netzwerk aus B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie E2A, Ebf1 oder Pax5, deren Expression für die B-Zellspezifikation und die Erhaltung der B-Zelldifferenzierung unabdingbar ist. Die Überexpression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 in diesen Mäusen, die ein verlängertes Überleben der Vorläuferzellen ermöglicht, fördert die Etablierung dieses B-Zellprogramms auch ohne Runx1-Expression und begünstigt folglich die Entstehung von frühen B-Zellprogenitoren. Die Differenzierung in IgM-exprimierende B-Zellen ist jedoch weiterhin blockiert (Niebuhr et al., 2013). Dieser Block in der Differenzierung der B-Vorläuferpopulationen ist jedoch noch nicht im Detail untersucht. Weiterhin sind, obwohl bereits Interaktionen zwischen Runx1 und anderen linienspezifischen Transkriptionsfaktoren wie Pax5 und Ebf1 beschrieben sind (Libermann et al., 1999; Maier et al., 2004), bisher nur wenig Zielgene von Runx1 identifiziert, die zu einem besseren Verständnis der Schlüsselfunktionen von Runx1 in der frühen B-Zelldifferenzierung beitragen könnten. Neue Erkenntnisse hierüber wären jedoch wichtig, um auch Rückschlüsse auf die Entstehung des Prä-B-zellspezifischen Differenzierungsblocks zu ziehen, der in ETV6-RUNX1 assoziierten B-Vorläufer-ALLs zu finden ist.

3 Fragestellung

Die Expression eines funktionalen Prä-B-Zellrezeptors (Prä-BZR) auf den frühen Prä-B-Zellen stellt den ersten wichtigen Kontrollpunkt während der B-Zellentwicklung dar und ist für die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen unerlässlich. Mutationen in den Komponenten des Prä-BZRs oder in nachgeschalteten Signalmolekülen können in der Folge zur Transformation der Vorläuferzellen beitragen. In akuten Leukämien, die einen solchen Prä-B-zellspezifischen Differenzierungsblock aufweisen, sind besonders häufig Mutationen des Transkriptionsfaktors RUNX1 zu finden. Auch Analysen von konditionalen *Runx1 knockout* Mausmodellen zeigen, dass die Aktivität von Runx1 für die Differenzierung B-zellspezifischer Vorläufer essentiell ist. Dennoch ist bisher nicht viel über die genaue Aktivität von Runx1 und seine spezifischen Zielgene in der frühen B-Zellentwicklung bekannt. Erkenntnisse hierüber sind jedoch für das Verständnis der Leukämieentstehung und für die Entwicklung neuer Therapieansätze von besonderer Bedeutung.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst der Differenzierungsblock während der frühen B-Zellentwicklung durch Analyse eines konditionalen *Runx1 knockout* Mausmodells, in dem die Deletion von *Runx1* erst in B-zellspezifischen Vorläufern stattfindet, genauer charakterisiert werden. Hierfür sollte die bisher genutzte FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Strategie zur Trennung der einzelnen B-Zellpopulationen optimiert werden.

Um die Funktion von Runx1 in diesem Zweig der Hämatopoese genauer zu verstehen, ist es zudem erforderlich direkte Zielgene von Runx1 zu identifizieren, die den Phänotyp der *knockout* Mäuse erklären könnten. Hierzu sollten potentielle Runx1-Zielgene hinsichtlich ihrer Funktion und Expression in den frühen B-Zellvorläufern untersucht und mithilfe einer genomweiten Analyse von Runx1-DNA-Bindungsstellen als direkte Zielgene bestätigt werden.

Weiterhin führten die oben beschriebenen Experimente zu der Hypothese, dass Runx1 ein wichtiges Effektor-Protein stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung ist und hier bestimmte Zielgene aktiviert, die wiederum die weitere B-Zelldifferenzierung vorantreiben. Die durch die Signalgebung des Prä-BZRs vermittelte Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein stellt dabei eine Möglichkeit dar, wie die transkriptionelle Aktivität von Runx1 gezielt beeinflusst werden könnte. Daher sollten mithilfe eines induzierbaren Zellsystems die Phosphorylierungslevel von Runx1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der frühen B-Zelldifferenzierung analysiert werden. Weiterhin sollte anhand von verschiedenen Phosphorylierungsmutanten von Runx1 sowie durch Verwendung verschiedener Kinase-Inhibitoren die Auswirkung der Phosphorylierung auf die Expression der Runx1-Zielgene untersucht und so die Bedeutung dieser Modifizierungen für die Runx1-Aktivität am Prä-BZR-Kontrollpunkt analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen BD Beckton-Dickinson (Heidelberg), Life Technologies (Darmstadt), Merck Millipore (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Taufkirchen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Thermo Scientific (Darmstadt) bezogen. Plastik-Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nümbrecht) und TPP (Trasadingen, Schweiz) verwendet.

4.1.1 Geräte

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

Bioanalyzer	Bioanalyzer 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn)
Durchflusszytometer	BD FACSCanto mit der FACS Diva Software Version 5.0.3 (Becton Dickinson, Heidelberg) BD FACSCanto II mit der FACS Diva Software Version 6.1.3 (Becton Dickinson, Heidelberg) BD FACSAria mit Sortierfunktion mit der FACS Diva Software Version 6.1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg)
ELISA-Reader	Tecan Sunrise Remote (Tecan Group, Männedorf, Schweiz)
LightCycler	LightCycler 480 II mit der LightCycler 480 Software Version 1.5.0 SP4 (Roche, Mannheim)
NanoDrop	ND-1000 V3.3.0 (Thermo Scientific, Karsruhe)
Pippin Prep	Sage Science (Beverly, MA, USA)
Sequenzierplattform	Genome Analyzer IIx (Illumina, San Diego, CA, USA)

4.1.2 Software für bioinformatische Analysen

Aligner	Bowtie Version 0.12.8 (Langmead et al., 2009)
Peakcaller	MACS Version 1.4.01 (Zhang et al., 2008)
Motivdatenbank	MEME *Multiple Em for Motif Elicitation* MEME Suite Version 4.8.1 (Bailey et al., 2009) MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011) TOMTOM *Motif ComparisonTool* (Gupta et al., 2007)

4.1.3 Medien

4.1.3.1 Bakterienkulturmedien

Lysogeny broth (LB)-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5 eingestellt mit NaOH
LB-Agar	LB-Medium, 15 g/l Bacto Agar (DIFCO, Lawrence, USA)

Die Medien wurden vor Gebrauch 20 min bei 121°C autoklaviert. Das LB-Medium sowie das LB-Agar wurden nach ausreichender Abkühlung mit 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin versetzt und anschließend verwendet.

4.1.3.2 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Lösungen und Medien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen: Biochrom (Berlin), Lonza (Köln), PAA (Pasching, Österreich), PAN Biotech (Aidenbach), Sigma (Taufkirchen) und Life Technologies (Darmstadt).

Lösungen

BSA-Lösung	2% BSA (w/v) gelöst in PBS
Chloroquine	Stock 25 mM, gelöst in PBS
Ciprobay® 200 mg	200 mg/100 ml Infusionslösung (Bayer Vital, Leverkusen)
FACS-Puffer	PBS, versetzt mit 0,5% (v/v) FCS
FCS	Fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin; Lonza, Köln; PAA (Pasching, Österreich), PAN Biotech, Aidenbach)
HBSS-Lösung	HBSS (1x) versetzt mit 20 mM Hepes
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1,5 mM KH2PO4; pH 7,4
Penicillin-Streptavidin	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin
Polybren-Lösung	Stock 8 mg/ml in PBS
Puromycin-Lösung	Stock 1 mg/mL in PBS
Trypsin/EDTA	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA (w/v)
(Z)-4-Hydroxytamoxifen (>98% Z-Isomer)	Stock 1 mg/ml (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma, Traufkirchen) gelöst in Ethanol

Zellkulturmedien

DMEM-293T	DMEM, 10% (v/v) FCS-Lonza, 4 mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 20mM Hepes
DMEM-SC-1	DMEM, 10% (v/v) FCS-PAA, 4 mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat
IMDM	IMDM-Trockensubstanz gelöst in Wasser (auf 280 mOs eingestellt); pH 7,6

IMDM-Medium	IMDM, 10% (v/v) FCS-Biochrom, 4 mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 50 µM ß-Mercaptoethanol, 5 ng/µl IL-7
MEMα-Medium	MEMα, 10% (v/v) FCS-PAA, 4 mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat
RPMI-Medium	10% (v/v) FCS-Biochrom, 4 mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 50 µM ß-Mercaptoethanol
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) FCS

Zytokine

Murines Interleukin-7 (IL-7)	Gelöst gemäß Herstellerangaben, Peprotech (Hamburg)

4.1.4 Puffer

4.1.4.1 DNA-analytische Methoden

DNA-Ladepuffer (6 x)	DNA-Loading Dye (6 x), Life Technologies (Darmstadt)
TAE (1x)	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure (pH 8,0)
TBE (1x)	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (pH, 8,0)
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

4.1.4.2 Proteinbiochemische Methoden

Westernblot-Analyse

Lysepuffer II	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 0,1% (v/v) Triton-X-100, 1mM DTT, 1mM EDTA, 1mM Natriumvanadat
Lysepuffer 1A	20 mM Hepes (pH 7,6), 20% Glycerol, 10 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% Triton-X-100, 1 mM DTT, 1mM Natriumvanadat, 50 µg/ml Pefabloc, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstastin A
Lysepuffer 1C	20 mM Hepes (pH 7,6), 20% Glycerol, 500 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% Triton-X-100, 1 mM DTT, 1mM Natriumvanadat, 50 µg/ml Pefabloc, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstastin A
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1,5 mM, KH2PO4 (pH 7,4)
4x Protein-Ladepuffer	500 mM Tris-HCl; 4% (w/v) SDS; 20-30% (v/v) Glycerol; 40 mM DTT; Bromphenol-Blau; pH 6,8
Laufpuffer (10x)	125 mM Tris-Base, 960 mM Glycin
Laufpuffer (1x)	12,5 mM Tris-Base, 96 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)
APS 10 %	1 g APS auf 10 ml ddH2O
SDS 10 %	1 g SDS auf 10 ml ddH2O
Sammelgel	500 mM Tris-HCl (pH 6,7), 5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) APS, 0,08% (v/v) TEMED

Trenngel	370 mM Tris-HCl (pH 8,8), 8,5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) APS, 0,05% (v/v) TEMED
Transferpuffer	1x Laufpuffer mit 20% (v/v) Methanol
TBS (1x)	10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl
TBS-T (1x)	1x TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
Blockpuffer	1x TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver
ECL-Strippuffer	62,5 mM Tris-Base, 69,3 mM SDS; pH 6,8

3C-Analyse

Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl2, 0,1 mM EGTA, 1x Complete Protease-Inhibitor
SDS 20%	2 g SDS auf 10 ml ddH2O
PK-Puffer	5 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% (w/v) SDS
TE (3C)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

Die Puffer für die 3C-Analyse wurden zusätzlich mit einem 0,22 µM Filter (Millex-GV, 0,22 µM, Millipore) filtriert.

4.1.5 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
T4 DNA-Ligase	Life Technologies (Darmstadt)
Ribonuclease A	Sigma (Taufkirchen)
Proteinase K	Sigma (Taufkirchen)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Scientific (Darmstadt) bezogen und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

4.1.6 Antikörper und Inhibitoren

4.1.6.1 Antikörper

Immunpräzipitation sowie Chromatin-Immunpräzipitation

Anti-Runx1$_{Israel}$	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Levanon und Y. Groner (Aziz-Aloya et al., 1998)
Rabbit IgG	unspezifischer Antikörper aus dem Kaninchen; Abcam (Cambridge, UK), #ab37415

Proteinbiochemische Methoden

Alle die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für Westernblot-Analysen sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Antikörper in TBS-T mit 2% (w/v) Magermilchpulver angesetzt.

Tab. 1: Primärantikörper für Westernblot-Analysen.
Mit einem * gekennzeichnete Antikörper wurden in TBS-T mit 2% (w/v) BSA gelöst.

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Bezeichnung	Hersteller
Aiolos *	Kaninchen	1:1000	K476	Zur Verfügung gestellt von A. Rebollo (Billot et al., 2011)
Blnk *	Kaninchen	1:1000	CST#3587	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
ERα	Maus	1:500	sc-8002	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Gapdh	Maus	1:3000	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Lamin	Ziege	1:2000	sc-6217	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Phoshpo-Blnk *	Kaninchen	1:1000	CST#3601	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Phospho p38	Kaninchen	1:1000	CST#9215	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Phospho-Tyrosin *	Maus	1:1000	CST#9416	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Phospho-Tyrosin	Ziege	1:1000	PAB13650	Abnova, Heidelberg
Runx1 *	Kaninchen	1:1000	CST#8529	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Runx1 N-20	Ziege	1:1000	sc-8563	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg

Tab. 2: Sekundärantikörper für Westernblot-Analysen.
Die Sekundärantikörper wurden in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver angesetzt. HRP: *Horseradish peroxidase*.

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Bezeichnung	Hersteller
Anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:5000	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Anti-Ziege IgG-HRP	Esel	1:5000	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5000	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Peroxidase-AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG LC spezifisch	Maus	1:10000	115-035-174	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

Durchflusszytometrie

Tab. 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antigen	Klon	Fluorochrom	Bezeichnung	Hersteller
CD4	RM4-5	FITC	553047	BD Biosciences
CD4	RM4-5	PE	553049	BD Biosciences
CD5	53-7.3	FITC	100606	BioLegend
CD5	53-7.3	PE	100608	BioLegend
CD19	6D5	APC	115512	BioLegend

CD19	6D5	PE-Cy7	115520	BioLegend
CD11b	M1/70	FITC	101206	BioLegend
CD11b	M1/70	APC	101212	BioLegend
CD11b	M1/70	PE	101208	BioLegend
CD25	PC61	PE	553866	BD Biosciences
CD43	1B11	APC	121214	BioLegend
B220	RA3-6B2	APC-Cy7	103224	BioLegend
Gr1	RB6-8C5	APC	108412	BioLegend
Gr1	RB6-8C5	FITC	101206	BioLegend
Gr1	RB6-8C5	PE	108408	BioLegend
Igκ	R26-46	FITC	553434	BD Biosciences
Igλ	187.1	FITC	550003	BD Biosciences
IgM	RMM1	PE	406508	BioLegend
NK1.1	PK136	FITC	108706	BioLegend
NK1.1	PK136	PE	553165	BioLegend
Ter119	TER-119	FITC	116206	BioLegend
Ter119	TER-119	PE	116208	BioLegend

Sonstige

Ziege anti-Maus IgM (µHC)	Antikörper für die Stimulation des Prä-B-Zellrezeptors, Southern Biotech (#1021-01)

4.1.6.2 Inhibitoren

RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)
Protease Inhibitor Cocktail II	Merck Millipore (Darmstadt)
1x Complete Protease Inhibitor	Roche (Mannheim)
PP2	Inhibitor für Kinasen der Src-Familie, Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt)
PD98059	MEK Inhibitor, Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt)
UO126	MEK1/2 Inhibitor, Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt)

4.1.7 Kits

Amersham ECL-Detection™ plus Kit	(GE Healthcare, München)
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DC Protein Assay Reagent A, B and S	Bio-Rad (München)
DNA Gel Extraction Kit	Millipore (Schwalbach)
EZ-ChIP Chromatin Immunoprecipitation Kit	Merck Millipore (Darmstadt)
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies (Böblingen)
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena (Jena)
iProofTM High-Fidelity PCR Kit	Bio-Rad (München)
LightCycler® 480 Probes Master	Roche (Mannheim)

Light Cycler 480 SYBR Green I Master	Roche (Mannheim)
NEXTflex™ ChIP Seq-Kit	Bioo Scientific (Austin, Texas, USA)
PeqGOLD TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
ProFection Mammalian Transfection System	Promega (Mannheim)
SuperSignal® West Femto Trial Kit	Thermo Scientific (Darmstadt)
Taq PCRCore Kit	Qiagen (Hilden)

4.1.8 Oligonukleotide

In den nachfolgenden Tabellen sind die für diese Arbeit relevanten Oligonukleotide zusammengestellt.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Primer für die quantitative Realtime-PCR.
Für alle PCR-Ansätze wurde das gleiche PCR-Programm gewählt. Lediglich die Annealingtemperatur variierte je nach spezifischem Primerpaar. F: *forward*, R: *reverse*

Zielgen	Bezeichnung	Fragmentgröße	Annealing-temperatur	Sequenz (5´→3´)
Runx1	cs736 (F) cs737 (R)	250 bp	62°C	ctt cct ctg ctc cgt gct ac gac ggt gat ggt cag agt ga
Spib	cs1692 (F) cs1693 (R)	186 bp	60°C	cgg aca gtg agt cag acg ag cct tgt gct tgg agg aga ac
Ikzf3	cs1285 (F) cs1287 (R)	238 bp	55°C	agg aca cat tct gtg gag aag ctc ggc ttt gat gtg tct tg
Igll1	cs1580 (F) cs1581(R)	88 bp	64°C	ttg gta tgt ctt tgg tgg tgg gac taa gga agg cag gaa cag agt gac
Hprt	MKF35 (F) MKF36 (R)	250 bp	62°C	gct ggt gaa aag gac ctc t cac agg act aga aca cct gc
Vκ	cs1468 (F) cs1666 (R)	220 bp	60°C	ggc tgc ags ttc agt ggc agt ggr tcw ggr ac tca ctg gat ggt ggg aag at

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer für die Genotyp-PCR.
Für alle PCR-Ansätze wurde das gleiche PCR-Programm gewählt. F: *forward*, R: *reverse*

Zielgen	Bezeichnung	Fragmentgröße	Annealing-temperatur	Sequenz (5´→3´)
Runx1	cs507 (R) cs508 (F)) cs509 (R)	260 bp (wt/wt) 325 (fl/fl) 380 bp (Δ/Δ)	55°C	gcc ggg tgc aat att aag tc tag gga gtg ctg ctt gct ct ctc tgg gaa acc agg gag tc
Cd79a^{hCre}	cs1183 cs1184	350 bp	55°C	ccc tgt gga tgc cac ctc gtc ctg gca tct gtc aga g

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Kontroll-Primer in der 3C-Analyse.
Für alle PCR-Ansätze wurde das gleiche PCR-Programm verwendet. Die Annealingtemperatur beträgt bei allen eingesetzten Primerpaaren 56°C. Bei den Primern im Genlocus für *Ikzf3* sind jeweils die *reverse*-Primer dargestellt, die zugehörigen *forward*-Primer sind in Tabelle 6 zu finden. F: *forward*, R: *reverse*, (T1-13): gibt die zugehörige Fragmentnummer der geschnittenen genomischen DNA im *Ikzf3*-Genlocus an.

Zielgen	Bezeichnung	Fragmentgröße	Sequenz (5´→3´)
Gapdh	cs1830 (F) cs1831 (R)	188 bp	tgt tcc tac ccc caa tgt gt cat cga agg tgg aag agt gg
Ercc3	cs1915 (F) cs1916 (R)	78 bp	gcc ctc cct gaa aat aag ga gac ttc tca cct ggg cct aca

Ikzf3	cs1931 (T1)	112 bp	cca cat tta cca gca tac ca
Ikzf3	cs1932 (T2)	246 bp	ata gta tac acc atg cca acc
Ikzf3	cs1933 (T3)	171 bp	gcg att tat tac cat gca gtg
Ikzf3	cs1934 (T4)	117 bp	gga ctt ttg gta tag cat tgc
Ikzf3	cs1935 (T5)	123 bp	gtc tgg cta gga tat cag aat
Ikzf3	cs1936 (T6)	189 bp	aat caa gtt cca gga caa cc
Ikzf3	cs1937 (T7)	179 bp	cag tac att tct tgg ctt tcc
Ikzf3	cs1938 (T8)	260 bp	aac tct ctt tct aaa cca ggc
Ikzf3	cs1939 (T9)	167 bp	aac taa agt gtg gct cat gt
Ikzf3	cs1940 (T10)	163 bp	aaa tgg ata gga gga agg atg
Ikzf3	cs1941(T11)	204 bp	gcc taa ttg cct tat aca cac
Ikzf3	cs1942 (T12)	196 bp	atg cat tcc agt cac tct tc
Ikzf3	cs1943 (T13)	226 bp	gat ctt ccc ttt ctc atc tca

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primer in der 3C-Analyse.
Für alle PCR-Ansätze wurde das gleiche PCR-Programm verwendet. Die Annealingtemperatur beträgt bei allen eingesetzten Primerpaaren 60°C. Zudem dient als *reverse*-Primer bei allen aufgeführten Primern das Oligonukleotid mit der Bezeichnung cs1917 (konstanter Primer C1). (T1-13): gibt die zugehörige Fragmentnummer der geschnittenen genomischen DNA im *Ikzf3*-Genlocus an.

Gen	Bezeichnung	Fragmentgröße	Sequenz (5´→3´)
Ikzf3	cs1917 (C1)	---	cgtc tca cct tga aga gc
Ikzf3	cs2033 (T0)	107 bp	gag tta gtt tgg gtc ttg ga
Ikzf3	cs1918 (T1)	97 bp	gat taa caa gtt tgg aac aca g
Ikzf3	cs1973 (T1)	153 bp	acc ttg atc ttt tgg cat ct
Ikzf3	cs1919 (T2)	89 bp	tca gta aaa tgg caa gtg gt
Ikzf3	cs1920 (T3)	132 bp	tat gtg cag tag agt caa gg
Ikzf3	cs1921 (T4)	235 bp	gag tat aat ttc gag cgg ct
Ikzf3	cs1974 (T4)	221 bp	gcg gct gga att ata gat ct
Ikzf3	cs1922 (T5)	151 bp	gca agt gta tag cca tct ga
Ikzf3	cs1923 (T6)	145 bp	tgg tat tga agt gtg tgt gt
Ikzf3	cs1977 (T6)	113 bp	aca ttc caa cta act tca ttg at
Ikzf3	cs1924 (T7)	173 bp	acc aca tag cac tgt aag tc
Ikzf3	cs1963 (T7)	133 bp	ctg gtt ggt tct tca gga tt
Ikzf3	cs1925 (T8)	151 bp	ata gtg tgt cat gtg agc tc
Ikzf3	cs1964 (T8)	226 bp	gat caa ggt gag act cca aa
Ikzf3	cs1926 (T9)	107 bp	ctg gat gag gag att tca gg
Ikzf3	cs1927 (T10)	167 bp	gga ttt gaa ctg tct gct tc
Ikzf3	cs1966 (T10)	175 bp	ttc tcc agg gat ttg aac tg
Ikzf3	cs1928 (T11)	177 bp	ccc agg cta gtc tca aat ac

Ikzf3	cs1981 (T11)	124 bp	ttg gca tta tag gtg tga gc
Ikzf3	cs1929 (T12)	107 bp	agg atc aag aac tca gga ga
Ikzf3	cs1968 (T12)	145 bp	gtt tct cct ttt ctg agc ca
Ikzf3	cs1930 (T13)	106 bp	tcc ttc ttt gag tga tgt gc

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Sonden bei der 3C-Analyse.

Gen	Bezeichnung	Markierung	Sequenz (5´→3´)
Ercc3	Probe Ercc3	5´Mod.: 6-Fam; 3´Mod.: BHQ-1	aag ctt gca ccc tgc ttt agt ggc c
Ikzf3	Probe Ikzf3	5´Mod.: 6-Fam; 3´Mod.: BHQ-1	ctc cac atc ttc tgc agt gag gat

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung der RUNX1-Phosphorylierungsmutanten.

Mutante	Bezeichnung	Sequenz (5´→3´)
Mutante A (R1579)	cs1753 (F)	cag atc caa cca Gcc cca ccg tgg tc
	cs1754 (R)	gac cac ggt ggg gCt ggt gga tct g
	cs1755(F)	gtg cac cca gca Gcg ccc att Gca cct gga cgt g
	cs1756(R)	cac gtc cag gtg Caa tgg gcg Ctg ctg ggt gca c
	cs1757(F)	gga tcc att gcc Gct cct tct gtg cac
	cs1758(R)	gtg cac aga agg agC ggc aat gga tcc
Mutante B (R1580)	cs1802(F)	cac cgt ggt cct Tcg atc agt cct Tcc aat acc tg
	cs1803(R)	cag gta ttg gAa gga ctg atc gAa gga cca cgg tg
	cs1804(F)	gat cag tcc ttc caa ttc ctg gga tcc att g
	cs1805(R)	caa tgg atc cca ggA att ggA agg act gat c
Mutante C (R1581)	cs1763(F)	gct cgc cct cct Tcc acc tgt Tct acg gcg cct c
	cs1764(R)	gag gcg ccg tag Aac agg tgg Aag gag ggc gag c
	cs1765(F)	ttc cac ctg ttc tTc ggc gcc tcg gcc g
	cs1766(R)	cgg ccg agg cgc cgA aga aca ggt gga a
	cs1767(F)	cgg ccg gct cct Tcc agt tct cca tgg
	cs1768(R)	cca tgg aga act ggA agg agc cgg ccg
Mutante 2B (R1605)	cs1944(F)	cac cgt ggt ccG acg atc agt ccG acc aat acc tg
	cs1945(R)	cag gta ttg gtC gga ctg atc gtC gga cca cgg tg
	cs1946(F)	gat cag tcc Gac caa Gac ctg gga tcc att g
	cs1947(R)	caa tgg atc cca ggt Ctt ggt Cgg act gat c
Mutante 2C (R1598)	cs1948(F)	gct cgc cct ccG acc acc tgG act acg gcg cct c
	cs1949(R)	gag gcg ccg tag tCc agg tgg tCg gag ggc gag c
	cs1950(F)	Gac cac ctg Gac Gac ggc gcc tcg gcc g
	cs1951(R)	cgg ccg agg cgc cgt Cgt Cca ggt ggt C
	cs1952(F)	cgg ccg gct ccG acc agt tct cca tgg
	cs1953(R)	cca tgg aga act ggt Cgg agc cgg ccg

4.1.9 Bakterienstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL10-GOLD® (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien mittels Ca^{2+} sowie deren Transformation und Kultivierung erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook & Russell, 2001).

4.1.10 Mausstämme

4.1.10.1 Konditionaler *Runx1* k*nockout*

Der konditionale *Runx1 knockout*-Stamm B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ wurde etabliert durch die Verpaarung von homozygoten B6.129-*Runx1*$^{fl/fl}$ Männchen mit heterozygoten, transgenen B6.129-*Cd79a*$^{hCre/1}$Weibchen (Hobeika et al., 2006; Putz et al., 2006)). Die Zucht der Tiere erfolgte anschließend durch Verpaarung von heterozygoten B6.129-*Runx1*$^{fl/wt}$ Männchen mit heterozygoten B6.129-*Cd79a*$^{hCre/1}$ Weibchen. Die Züchtung sowie die Bestimmung der Genotypen wurde von U. Müller (Retrovirale Pathogenese, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt. Für die Versuche wurden die transgenen Mäuse verwendet, die homozygot für das mit LoxP-Sequenzen flankierte *Runx1*-Gen und zusätzlich heterozygot für das *Cd79a*$^{hCre/1}$-Gen waren.

4.1.10.2 B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J (*Rag1*$^{-/-}$)

Als Donor für die Etablierung einer Pro-B-Zelllinie diente in dieser Arbeit der Mausstamm B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J (Jackson Laboratory, Maine, USA). Diese Mäuse sind homozygot für die *Rag1*^{tm1Mom} Mutation und durch das Fehlen von reifen B- und T-Zellen im Knochenmark sowie in der Milz bzw. im Thymus charakterisiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Mäuse als *Rag1*$^{-/-}$ bezeichnet.

4.1.10.3 C57BL/6J

Für die Isolierung der verschiedenen B-Zellvorläuferpopulationen wurden Mäuse des Mausstammes C57BL/6J (Jackson Laboratory, Maine, USA) im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Die Zucht dieser Tiere erfolgte ebenfalls durch U. Müller (Retrovirale Pathogenese, Heinrich-Pette-Institut).

4.1.11 Zellen

4.1.11.1 Primäre Zellen

Es wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen isoliert und diese auf frühe unreife B-Vorläuferzellen selektioniert (negative Selektion von Zellen, die CD4, CD5, CD11b, Gr1, Igκ, Igλ, NK1.1 und Ter119 exprimieren sowie anschließende positive Selektion auf CD19).

4.1.11.2 Zelllinien

BMiFLT3

Pro-B-Zellen, isoliert aus Tumorzellen aus dem Knochenmark von C57BL/6J Mäusen. Die Zellen sind charakterisiert durch eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors aufgrund der Insertion einer internen Tandemduplikation (FLT3-ITD). Die Kultivierung erfolgte in MEMα, 10% (v/v) FCS (PAA).

Oct

Blnk (SLP65)-defiziente Prä-B-Zelllinie, gewonnen aus dem Knochenmark von *Blnk*$^{-/-}$ Mäusen (Su et al., 2003). Die Kultivierung erfolgte in IMDM, 10% (v/v) FCS (Biochrom), 50 µM ß-Mercaptoethanol und 5 ng/ml IL-7.

Phoenix-gp

Derivat aus der aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnenen Zelllinie 293, in welche das temperatursensitive Gen für das SV40 (*simian virus 40) large T antigen* eingebracht wurde (ATCC #CRL-11268). Die Kultivierung erfolgte in DMEM, 10% (v/v) FCS (Lonza bzw. PAN) und 20 mM Hepes.

SC-1

Aus murinen embryonalen Fibroblasten gewonnene Zelllinie (ATCC #CRL-1404). Die Kultivierung erfolgte in DMEM, 10% (v/v) FCS (PAA).

4.1.12 Vektoren

Aufgeführt ist die laborübliche Nomenklatur zur Beschreibung der Vektoren. Hierbei ist zu beachten, dass mit R gekennzeichnete Vektoren in der Arbeitsgruppe „Retrovirale Pathogenese“ hergestellt wurden, während mit # gekennzeichnete Vektoren aus anderen Quellen bezogen wurden.

γ-retrovirale Konstrukte

R1330 pRMYsiGFP, gammaretroviraler Vektor mit eGFP als Reportergen

R1421 pRMys-BCR/ABL-myc-iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz des Fusionsproteins Onkogen BCR/ABL, Venus als Reportergen

R1455 pRMys-hBCLX-iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz des humanen BCL-X Proteins, Venus als Reportergen

R1513 pRMys-strep-hRUNX1wt-ERt2-iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, Venus als Reportergen

R1579 pRMys-strep-hRUNX1mut-ERt2iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, in der die Aminosäurereste S249A, S266A, T273A und S276A mutiert wurden, Venus als Reportergen

R1580 pRMys-strep-hRUNX1mut-ERt2iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, in der die Aminosäurereste Y258F, Y260F und Y254F mutiert wurden, Venus als Reportergen

R1581 pRMys-strep-hRUNX1mut-ERt2iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, in der die Aminosäurereste Y375F, Y378F, Y379F und Y386F mutiert wurden, Venus als Reportergen

R1598 pRMys-strep-hRUNX1mut-ERt2iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, in der die Aminosäurereste Y375D, Y378D, Y379D und Y386D mutiert wurden, Venus als Reportergen

R1605 pRMys-strep-hRUNX1mut-ERt2iV, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz der humanen RUNX1 Isoform 1b, in der die Aminosäurereste Y258D, Y260D und Y254D mutiert wurden, Venus als Reportergen

#838 pCru5 HC iGFP, gammaretroviraler Vektor, trägt die kodierende Sequenz für eine bereits rekombinierte schwere Kette des B-Zellrezeptors, eGFP als Reportergen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hans-Martin Jäck, Erlangen)

#856 pMig-ERt2-mSLP65-iG, gammaretroviraler Vektor, trägt die Sequenz für ein SLP65-ERt2 Fusionsprotein, eGFP als Reportergen (Meixlsperger et al., 2007)

Helferplasmide für die Virusproduktion

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

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

BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*)

Ikzf3 BAC-Klon RP23-240N16 (RPCI), Genome Cube®, Source Bioscience (Nottingham, UK), #RPCIB731N16240Q

Ercc3 BAC-Klon RP23-148C24 (RPCI), Genome Cube®, Source Bioscience (Nottingham, UK), #RPCIB731C24148Q

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer 5% igen CO_2 Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Wenn nicht anders angegeben, wurde mit vorgewärmten Medien und Lösungen gearbeitet. Zudem erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 300 x g für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT).

4.2.1.1 Kontinuierliche Kultivierung von adhärenten Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in beschichteten Gewebekulturschalen, wobei die Zellen subkonfluent gehalten wurden. Je nach Wachstum der Zellen wurden diese alle zwei bis drei Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend entsprechend der Verdünnung in frischem Medium aufgenommen.

4.2.1.2 Kontinuierliche Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung der verschiedenen Suspensionszelllinien erfolgte in nicht beschichteten Zellkulturschalen. Je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:8 bis 1:10 verdünnt.

4.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden adhärent wachsende Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA abgelöst bzw. suspendiert wachsende Zellen direkt aus der Kultur entnommen und 2-4x10^6 Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in Einfriercontainern (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) über Nacht bei -70°C gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zügig bei 37°C erwärmt und in 10 ml frisches Medium getropft, um das DMSO im Einfriermedium auszudünnen. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Medium wie oben beschrieben kultiviert.

4.2.1.4 Herstellung retroviraler Pseudotypen

Zur Produktion infektiöser retroviraler Partikel wurden drei Vektoren mithilfe der Calciumphosphatmethode in die Produzentenzelllnie 293T eingebracht. Der γ-retrovirale Vektor kodierte dabei für das einzubringende Gen von Interesse (Zielgen) sowie für die viralen Verpackungssignale. Essentielle virale Sequenzen, die für die viralen Struktur- und Replikationsproteine kodieren, wurden zuvor entfernt. Durch Ko-Transfektion von zwei Helferplasmiden, die wiederum die Sequenzen für die viralen Strukturproteine, Enzyme und

Hüllproteine (*gag*, *pol* sowie *env*) aufweisen, jedoch keine Verpackungssignale tragen, entstanden infektiöse, aber nicht replikationskompetente Viruspartikel. Diese induzierten durch die Integration des Provirus in das Genom der Zielzelle die Expression des Zielgens (Zufferey et al., 1998). Dabei wurden die murinen Zielzellen durch Verwendung von *Ecoenv* als Gen, das für das Hüllprotein kodiert, über den Rezeptor mCat1 infiziert.

Die Transfektion erfolgte mithilfe des *ProFection Mammalian Transfection System* Kits. Hierzu wurden ungefähr 16 Stunden vor der Transfektion 4x10^6 293T-Zellen ausgesät. Bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wurde, wurde das DMEM-Medium erneut gewechselt und mit 25 µM Chloroquin versetzt. Für den Transfektionsansatz wurden 5 µg des γ-retroviralen Vektors, 10 µg pSV40-gag/pol und 3 µg pEcoenv mit 250 mM Calciumchlorid versetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 500 µL aufgefüllt. Dieser DNA/Calciumchlorid-Mix wurde tropfenweise in 2x Hepespuffer gegeben, wobei mithilfe einer Pisteurpipette Luftblasen im Präzipitationspuffer erzeugt wurden. Zur Bildung der Calciumphosphat/DNA-Präzipitate wurde der Ansatz 20 min bei RT stehen gelassen und anschließend tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben. Nach 8-10 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 6 ml frisches Medium ohne Chloroquin ersetzt. Die Abnahme des Virusüberstandes und Zugabe von 6 ml frischem Medium erfolgte fünfmal infolge alle 9-14 Stunden. Nach Filtration (Millex-GP Filter, 0,22 µm, Millipore) wurde der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert.

4.2.1.5 Titerbestimmung mittels FACS-Analyse

Zur Bestimmung der Anzahl der Viruspartikel pro Milliliter produziertem Überstand wurden SC-1 Fibroblasten mit einem definierten Volumen der jeweiligen Virusüberstände transduziert. Hierzu wurden 5x10^4 SC-1-Zellen in einer 24-Loch-Platte in 500 µl Medium ausgesät und mit 8 µM Polybren versetzt. Anschließend wurden 20 µl bzw. 100 µl der Virusüberstände auf die Zellen gegeben und die Platte für 60 min bei 900 x g und RT zentrifugiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel ohne Zugabe von Polybren. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und der Anteil transduzierter SC-1 Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Der Virustiter wurde nach folgender Formel berechnet: $T = NxP/V$ (T:Titer, N:Anzahl an ausgesäten Zellen, P:Anteil an transduzierten Zellen, V:Volumen des eingesetzten Virusüberstandes).

4.2.1.6 Transduktion von Zielzellen

Direkte Transduktion

Für die direkte Transduktion von Zielzellen (*spin oculation*) wurden 1x10^6 Zellen in 1,5 ml Zellkulturmedium in einer 6-Loch-Platte ausgesät und 1,5 ml entsprechender Virusüberstand zugegeben. Zudem wurden die Ansätze mit 8 µM Polybren versetzt und für 60 min bei 900 x g und RT zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde die Transduktion wiederholt. Zur Anreicherung der

transduzierten Zellen wurden diese nach einigen Tagen in Kultur mithilfe des Durchflusszytometers sortiert (vgl. 4.2.1.8).

Transduktion über Retronektin

Für die Transduktion der Zielzellen über Retronektin (50 µg/ml, TaKaRa, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) wurden zunächst unbeschichtete 12-Loch-Platten über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei RT mit je 1 ml Retronektion pro Loch beschichtet. Nach Abnahme des Retronektins erfolgte die Zugabe von 1ml BSA-Lösung für 30 min, bevor die Löcher mit HBSS-Lösung gespült wurden. Zur Beschichtung der Platten mit Virusüberstand wurden je 1 ml Überstand pro Loch verwendet, die Platten für 30 min bei 900 x g und 4°C zentrifugiert und der Virusüberstand anschließend verworfen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, bevor $5x10^5$ Zellen in 2 ml Zellkulturmedium auf die nun beschichteten Platten gegeben wurden. Dieser Vorgang wurde am nächsten Tag wiederholt und die Zellen vom Vortag auf die neu beschichteten Platten überführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in neue, unbeschichtete 12-Loch-Platten gegeben und ohne Anreicherung der transduzierten Zellen weiter kultiviert oder diese konnten durchflusszytometrisch angereichert und weiter kultiviert werden.

4.2.1.7 Tamoxifeninduktion

Um die Translokation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in den Zellkern zu induzieren, wurden die transduzierten BMiFLT3-Zellen für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt. Um in der mit dem BLNK-ERt2 Fusionsprotein transduzierten Oct-Zelllinie den Prä-B-Zellrezeptor (Prä-BZR)-Signalweg zu induzieren, wurden diese Zellen je nach Versuchsansatz zehn Minuten bis 48 Stunden mit 1 µM 4-OHT behandelt. Das 4-OHT wurde jeweils direkt zum Zellkulturmedium gegeben.

4.2.1.8 Durchflusszytometrie – FACS-Analyse

Um Einzelzellsuspensionen zu analysieren, können die Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und/oder Fluoreszenz mithilfe der Fluoreszenz-aktivierten durchflusszytometrischen Messung (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) charakterisiert werden. Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom mit hoher Geschwindigkeit an verschiedenen Lasern vorbeigeführt und das dabei von ihnen emittierte Licht wird von verschiedenen Detektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) hängt als Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel vom Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) als Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel von der Granularität, der Größe und Struktur des Zellkerns sowie vom Vorkommen von Vesikeln in der Zelle abhängt. Weiterhin können Fluoreszenzfarbstoffe, die durch spezifische Antikörper an die Zelle gekoppelt oder von Reportergenen in der Zelle gebildet werden, zur genaueren Analyse der Zellen genutzt werden. Werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, muss die Überlappung der Emissionspektren der einzelnen Fluorochrome berechnet und in den dargestellten Ergebnissen

berücksichtigt werden. Dies wird mithilfe der automatischen Kompensationsfunktion der auf dem jeweiligen Durchflusszytometer installierten FACS Diva Software erreicht.

Für die Analyse der Zellen wurden zunächst Einzelzellsuspensionen hergestellt, diese mit PBS gewaschen und 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Die Färbung der Zellen erfolgte in 500 µl FACS-Puffer, wobei 0,2 bis 0,5 µg Antikörper pro $1x10^6$ Zellen verwendet und die Ansätze für mindestens 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, die pelletierten Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

4.2.1.9 Durchflusszytometrie – FACS-Sortierung

Zur Sortierung von Zellpopulationen mit unterschiedlichen Charakteristika wird der Flüssigkeitsstrom im Durchflusszytometer nach Detektion der Lichtbrechung und der Fluoreszenzsignale durch einen nachgeschalteten Vibrator in einzelne Tropfen unterteilt, wobei idealerweise eine einzelne Zelle pro Tropfen vorliegt. Die Tropfen erhalten dann je nach vorher festgelegten Sortierkriterien unterschiedliche elektrische Ladungen, werden entsprechend dieser Ladungen im dahinter geschalteten elektrischen Feld abgelenkt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert.

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie in 4.2.1.9 beschrieben. Nach Färbung der Zellen wurden diese in FACS-Puffer, versetzt mit 8 µg/ml Ciprobay, in einer Konzentration von $1x10^7$ Zellen pro 1 ml aufgenommen und zusätzlich zur Vereinzelung der Zellen durch ein steriles Sieb filtriert. Sollten die Zellen im Anschluss an die Sortierung weiter kultiviert werden, wurden die sortierten Zellen mit PBS gewaschen und in entsprechendem Kulturmedium (inklusive 8 µg/ml Ciprobay) aufgenommen. Bei anschließender Isolierung von RNA oder Protein aus den sortierten Zellen erfolgte das durchflusszytrometische Sortieren unter Kühlung bei 4°C in FACS-Puffer.

4.2.1.10 Kompetitionsassay in BMiFLT3-Zellen

Um zu analysieren, ob die mit dem RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transduzierten BMiFLT3-Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen Unterschiede in Proliferation oder Vitalität aufweisen, wurde ein Kompetitionsassay durchgeführt. Hierzu wurden nicht-transduzierte GFP-positive BMiFLT3-Zellen mit transduzierten GFP/Venus-positiven Zellen gemischt, bis eine Zellsuspension mit 50% doppelpositiven Zellen erhalten wurde. Der Anteil an positiven Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Für den Versuch wurden $2x10^5$ Zellen pro Ansatz in einer 12-Loch-Platte ausgesät. Um den Einfluss der Aktivierung von RUNX1-ERt2 auf die Zellen zu analysieren, wurden die Ansätze mit 0,2 µM 4-OHT oder absoluten Ethanol (EtOH) als Kontrolle behandelt. Der Anteil an doppelpositiven Zellen wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen alle 24 Stunden mittels FACS-Analyse verfolgt.

4.2.2 Tierexperimentelle Methoden

4.2.2.1 Identifikation transgener Mäuse

Drei Wochen nach der Geburt wurde allen Tieren der B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Zucht eine Ohrlochmarkierung gesetzt und aus diesem Stanzenmaterial mithilfe des innuPREP DNA Mini Kits (Analytik Jena, Jena) genomische DNA isoliert. 2 µl dieser DNA wurde in einer PCR nach Standardbedingungen (Taq PCRCore Kit, Qiagen, Hilden) eingesetzt. Je nach Genotyp zeigte die PCR mit der Primer-Kombination cs507, cs508 und cs509 (vgl. Tabelle 5) Banden verschiedener Größen, sodass eine Identifizierung der gefloxten bzw. Wildtyp-Allele von *Runx1* möglich war bzw. die Deletion von *Runx1* identifiziert werden konnte. Die Primer cs1183 und cs1184 dienten zur Identifizierung des *Cd79a*^{hCre} Transgens (vgl. Tabelle 5).

4.2.2.2 Isolierung von murinem Knochenmark

6-10 Wochen alte Mäuse wurden mit Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) in Narkose versetzt und durch zervikale Dislokation getötet. Durch Zugabe von 80% (v/v) EtOH wurden die Tiere semi-sterilisiert und das Knochenmark aus Femur und Tibia mithilfe einer 1 ml-Spritze mit einer 23 Gauge-Kanüle unter der Sicherheitswerkbank steril isoliert. Hierzu wurden die Knochen mit IMDM/5% (v/v) FCS ausgespült und die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und RT wurden die Zellen in PBS/0,5% (v/v) FCS/Ciprobay (8 µg/ml) aufgenommen und wie unter 4.2.1.8 bzw. 4.2.1.9 beschrieben für die weitere FACS-Analyse bzw. Sortierung vorbereitet.

4.2.2.3 Analyse von B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mäusen

Die B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mäuse wurden hinsichtlich einer Blockade in der frühen B-Zelldifferenzierung mithilfe von FACS- sowie Genexpressionsanalysen untersucht. Dazu wurden die Knochenmarkszellen von B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mäusen und B6.*Runx1*$^{wt/wt}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mäusen isoliert (vgl. 4.2.2.2) und die Zellpopulationen der verschiedenen B-Zellvorläufer mithilfe einer Kombination von mehreren Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern mittels FACS-Analyse untersucht Für die RNA-Isolierung (vgl. 4.2.3.2) wurden die unterschiedlichen Zellpopulationen durchflusszytometrisch sortiert, anschließend mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in Trizol gelagert.

4.2.3 Nukleinsäure-analytische Methoden

4.2.3.1 Standardmethoden

Agarose-Gelelektrophorese, Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten Bakterien, Ethanol-Präzipitation, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen sowie Ligationsreaktionen und PCR-Analysen wurden nach Standardmethoden (Sambrook & Russell, 2001) durchgeführt und werden nicht näher beschrieben. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus

Bakterienkulturen (DNA Plasmid Mini/ Midi/ Maxi Kit, Qiagen, Hilden) sowie die Isolierung von DNA aus Agarosegelen (DNA Gel Extraction Kit, Millipore, Schwalbach) erfolgte anhand der Herstellerangaben.

4.2.3.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Zellen erfolgte mittels Trizol (peqGOLD TriFast, Peqlab Biotechnologie, Erlangen), wobei $5x10^6$-$1x10^7$ Zellen in 1ml Trizol vorlagen. Zu den in Trizol resuspendierten Zellen wurde im nächstem Schritt 0,2 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz für 15 Sekunden fest geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g für 15 min wurde die obere Phase mit der RNA in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit 600 µl Isopropanol versetzt und mehrfach invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 25°C erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g für 15 min, um die RNA zu präzipitieren. Das RNA-Pellet wurde im Anschluss zweimal mit 1 ml 75%igem EtOH gewaschen und jeweils für 15 min bei 4°C und 7400 x g zentrifugiert. Nach kurzer Trocknung wurde die RNA in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und 0,5 µl RNAse Inhibitor zugegeben. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch am Nanodrop bestimmt.

4.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die reverse Transkription wurde 1 µg der isolierten zellulären Gesamt-RNA eingesetzt. Mithilfe von *Random*-Primern (Primer random $p(dN)_6$, Roche, Mannheim) sowie einer AMV Reversen Transkriptase (New, England Biolabs, Frankfurt) erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA gemäß dem Herstellerprotokoll.

4.2.3.4 Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR)

SYBR-Green

Mithilfe der semi-quantitativen *Realtime*-PCR können relative Transkriptmengen verschiedener Zielgene in unterschiedlichen cDNA-Proben gemessen und miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* verwendet, der während der qRT-PCR in doppelsträngige DNA interkaliert, wobei das Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, welches mit zunehmender DNA-Menge ansteigt. Durch Bestimmung der Transkriptmenge eines Referenzgens (*Housekeeping*-Gen), welche ebenfalls in allen cDNA-Proben gemessen wird, können die Zielgene in den cDNA-Proben relativ zueinander verglichen werden. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen kann in stark vereinfachter Form wie folgt dargestellt werden:

$$n - fache\ Expression = \frac{\text{Zielgen}_{\text{Probe A}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Probe A}}} \Big/ \frac{\text{Zielgen}_{\text{Probe B}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Probe B}}} \ .$$

In dieser Arbeit wurden die qRT-PCRs zur Bestimmung relativer Transkriptmengen mithilfe des Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kits (Roche, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben

durchgeführt. Als Referenzgen diente die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*). Die Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte für jede Probe in zwei voneinander unabhängigen Läufen jeweils als Duplikat. Für alle qRT-PCRs wurde ein Standardprogramm verwendet. Die Annealing-Temperaturen der verschiedenen Primerpaare sind Tabelle 4 zu entnehmen. Auf eine initiale Denaturierung (10 min, 95°C) folgte ein Zyklus aus Denaturierung (10 Sekunden (sec), 95°C), Annealing (10 sec, x°C) und Elongation (10 sec, 72°C), welcher 40x wiederholt wurde. Im letzten Schritt erfolgt die Erhöhung der Temperatur im Reaktionsgefäß auf 95°C zur Bestimmung der für jedes PCR-Produkt spezifischen Schmelzkurve.

TaqMan-Sonden (Hydrolyse-Sonden)

Für die Quantifizierung der entstandenen Ligationsprodukte in der 3C-Analyse (siehe 4.2.3.6) wurden TaqMan-Sonden basierte qRT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-System. TaqMan-Sonden sind kurze Oligonukleotide (20-25 bp), die je nach Sequenz an eine spezifische Basenabfolge in der DNA binden. Diese Sonden sind an einem Ende mit einem Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) und an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei intakten Sonden sind Quencher und Reporter in räumlicher Nähe lokalisiert, sodass der durch eine Lichtquelle angeregte Reporter einen Teil seiner Energie an den Quencher abgibt, ohne das Licht emittiert wird (FRET). Während des PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit der DNA und aufgrund der 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird das 5´ Ende der Sonde mit dem Quencher abgebaut. Infolgedessen kann die Energie des Reporters nicht mehr auf den Quencher übertragen und somit als Fluoreszenzsignal am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen werden. Mit zunehmender Menge des für die Sonde spezifischen PCR-Produkts nimmt somit auch die Fluoreszenz zu und dient der relativen Quantifizierung des PCR-Produkts.

In dieser Arbeit wurde das LightCycler® 480 Probes Master Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nähere Angaben zu den in den qRT-PCRs eingesetzten Primern und Sonden sind in Abschnitt 4.2.3.6 zu finden.

4.2.3.5 Chromatinimmunpräzipitation-DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq)

Zur Analyse der genomweiten Bindungsstellen von Runx1 in frühen B-Zellvorläufern wurde eine Chromatinimmunpräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq) durchgeführt. Hierzu wurden mit dem RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transduzierte BMiFLT3-Zellen für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT behandelt. Durch anschließende Zugabe von 1% Formaldehyd wurden Proteine und DNA quervernetzt, die Zellen lysiert und das Chromatin isoliert. Mithilfe von Sonifizierung wurde das Chromatin in 200-500 bp kleine Fragmente geschert und das Material von $1x10^7$ Zellen mittels Protein-G-Agarose *beads* gereinigt, um mögliche unspezifische Bindungen zu reduzieren. Für die Chromatinimmunpräzipitation wurde entweder ein spezifischer Runx1-Antikörper ($Runx1_{Israel}$) oder

Kaninchen IgG (Abcam) verwendet. Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend mittels Protein G Sepharose 4 Fast Flow-Agarose-*beads* (GE Healthcare, Freiburg) gebunden und das Chromatin mithilfe des EZ-ChIP Chromatin *Immunoprecipitation* Kits entsprechend den Herstellerangaben eluiert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des NEXTflex™ ChIP Seq-Kits mit Adaptermolekülen ligiert, DNA-Fragmente zwischen 350-550 bp mittels PippinPrep isoliert und durch PCR amplifiziert. Die fertigen Sequenzierbibliotheken wurden quantifiziert und die Fragmentgrößen unter Anwendung des Bioanalyzer und des High Sensitivity DNA Kits analysiert. Die Sequenzierung erfolgte im Genome Analyzer IIx (Illumina). Die aus der Runx1-Immunpräzipitation (IP) sowie der IgG-Kontrolle erhaltenen *reads* wurden mit dem Programm Bowtie (Version 0.12.8) mit dem Mausgenom (mm9, UCSC) aligniert. Mithilfe der Software MACS wurden Runx1-gebundene Regionen (*peaks*) bestimmt, indem die Daten der Runx1-IP und der Kontroll-IgG-IP miteinander verglichen wurden. Runx1 gebundene Gene wurden durch die Annotationen in der UCSC (*University of California*, Santa Cruz)-Genomdatenbank identifiziert. Um mögliche *de novo* DNA-Bindungsmotive anderer Transkriptionsfaktoren in der Nähe der Runx1-gebundenen Regionen zu finden, wurde die MEME-Software verwendet. Diese wählt zufällig 500 der Runx1 *peaks* aus und sucht 75 bp stromaufwärts und stromabwärts dieser Runx1 *peaks* nach überrepräsentierten DNA-Motiven. Diese wurden anschließend mithilfe der TOMTOM Software mit bereits bekannten Motiven der Datenbanken *JASPER Core 2009 vertebrates* und *UniPROBE-mouse* verglichen.

4.2.3.6 3C-Analyse des *Ikzf3* Genlocus

Mit der 3C (*chromosome confirmation capture*)-Analyse ist es möglich, Interaktionen zwischen verschiedenen Regionen eines Chromosoms zu detektieren, die ihrer Primärstruktur mehrere hundert Kilobasen voneinander entfernt liegen. Hierzu werden zunächst die in den Zellen interagierenden Chromosomenregionen durch Zugabe von Formaldehyd vernetzt. Anschließend erfolgen die Lyse der Zellen und die Restriktion der isolierten DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym, wodurch freie DNA-Enden entstehen. DNA-Regionen, die im linearen Genom normalerweise weit voneinander entfernt liegen, sind aufgrund der Quervernetzung nun in räumlicher Nähe positioniert. Durch Ligation dieser freien DNA-Enden können in einem letzten Schritt mittels TaqMan-basierter qRT-PCR die Ligationsprodukte quantifiziert und eine mögliche Anreicherung bestimmter Ligationsprodukte analysiert und somit die spezifische Interaktion zwischen zwei chromosomalen Regionen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Interaktion des *Ikzf3*-Promoters mit der Runx1-gebundenen *Enhancer*-Region 90 kb stromabwärts des *Ikzf3*-Promoterbereichs untersucht werden. Für diese Analyse wurden mit dem RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transduzierte BMiFLT3-Zellen für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT behandelt. Die Durchführung der Analyse erfolgte nach dem Protokoll von Hagege et al. (Hagege et al., 2007). Es wurden $1x10^7$ Zellen pro Ansatz verwendet und

der Assay zur Bestätigung der Ergebnisse dreimal wiederholt. Für die Restriktion der DNA wurde die Restriktionsendonuklease HindIII verwendet. Als Kontrolle diente der Locus des *Ercc3* Gens, der keine spezifischen chromosomalen Interaktionen zeigen sollte und somit als Normalisierung für die 3C-qRT-PCR-Daten des Ikzf3-Locus genutzt werden konnte. Zudem wurde das Expressionslevel von *Gapdh* in der 3C-Probe bestimmt und als interne Ladungskontrolle für eine weitere Normalisierung der Daten verwendet. Alle in diesem Experiment genutzten Primer sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen, die für den *Ikzf3*-Locus und den *Ercc3*-Locus designten TaqMan-Sonden sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die TaqMan-PCRs wurden unter Verwendung des LightCycler® 480 Probes Master Kits gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

4.2.4.1 Stimulation des Prä-BZR-Signalweges in Oct-Zellen sowie *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen

Zur Wiederherstellung eines funktionalen Prä-BZR-Signalwegs in den *Blnk*-defizienten Oct-Zellen wurden diese zunächst mit einem BLNK-ERt2-Fusionsprotein (#856), wie unter 4.2.1.7 beschrieben, transduziert. Die Expression dieses Fusionsproteins ermöglichte in diesen Zellen die gezielte Induktion der Signalkaskade stromabwärts vom Prä-BZR durch Zugabe von 1 µM 4-OHT und 10 µg/ml eines Antikörpers gegen den Prä-BZR (µHC, Southern Biotech). Zum Kontrollansatz wurden entsprechende Mengen absoluter EtOH und PBS gegeben. Pro Ansatz wurden 1x10^7 Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und je nach Fragestellung unterschiedlich lang bei 37 °C stimuliert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 4 ml kaltem PBS, gefolgt von einer Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 4°C und 300 x g. Für die Kinase-Inhibitor-Versuche wurden die Zellen vor Stimulation für eine Stunde mit dem entsprechendem Inhibitor oder DMSO als Kontrolle behandelt. Anschließend wurde je nach Versuchsansatz RNA (vgl. 4.2.3.2) oder Protein (vgl. 4.2.4.2) aus den Zellen isoliert.

Um den Prä-BZR-Signalweg in den *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen zu induzieren, wurden die Zellen mit einem Vektor (#838) transduziert, der für eine bereits rekombinierte und funktionale schwere Kette des BZRs kodiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Leervektor (R1330) transduziert wurden (siehe 4.2.1.6). Die Inkubation der Zellen im Brutschrank erfolgte je nach Versuchsansatz für 48, 72 oder 96 Stunden, bevor der transduzierte Anteil der Zellen, wie unter 4.2.1.9 beschrieben, mittels FACS sortiert und RNA oder Protein aus den sortierten Zellen isoliert wurde.

4.2.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Analyse der differentiellen Proteinexpression sowie der Phosphorylierung von Runx1 wurden aus zwei verschiedenen induzierbaren Zellsystemen (siehe 4.2.4.1) Gesamtzellextrakte hergestellt. Dazu wurden 1-2x10^7 Zellen mit kaltem PBS gewaschen, 5 min bei 4°C und 300 x g zentrifugiert und anschließend in 200 µl Lysepuffer II aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von

60 min auf Eis mit mehrmaligem vortexen wurden die Zellen zusätzlich mit einem Handhomogenisator aufgebrochen. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 16100 x g und 4°C. Für die direkte Analyse der Lysate mittels Westernblot-Analyse wurden diese nach Proteinbestimmung mit 4x Probenpuffer versetzt und aliquotiert bei -80°C gelagert.

4.2.4.3 Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Um die Translokation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in den Zellkern der BMiFLT3-Zellen nachzuweisen, wurden 24 Stunden nach Zugabe von 4-OHT Kern- und Zytoplasmafraktionen isoliert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer 1A resuspendiert, sodass eine Konzentration von $2{,}5x10^7$ Zellen/ml vorlag. Nach einer Zentrifugation des Ansatzes bei 4°C und 500 x g für 5 min wurde der Überstand (Zytoplasmafraktion) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 4x Probenpuffer versetzt. Das verbliebene Pellet wurde in Puffer 1B aufgenommen ($2{,}5x10^7$ Nuclei/ml Puffer) und für eine Stunde bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Zur vollständigen Lyse der Nuclei wurde der Ansatz anschließend zweimal 30 sec mithilfe des Bioruptor bei mittlerer Stufe sonifiziert. Nach erneuter Zentrifugation (9000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand (Kernfraktion) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 4x Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinmenge der einzelnen Lysate im Westernblot anpassen zu können, wurde mithilfe des BioRad DC-Protein Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Hierzu wurden 1:10 Verdünnungen der Lysate hergestellt und die Proben gemäß den Herstellerangaben weiter aufgearbeitet. Zur Verringerung des Messfehlers wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 620 nm im ELISA-Messgerät. Anhand einer parallel gemessenen BSA-Standardkurve konnte anschließend die Konzentration der Lysate berechnet werden.

4.2.4.5 Immunpräzipitation

Für die Analyse der Phosphorylierung von Tyrosinresten im Runx1-Protein vor und nach Induktion des Prä-BZR-Signalwegs wurde eine Anreicherung von Runx1 mithilfe einer IP durchgeführt. Hierzu wurden die Gesamtzellextrakte wie in 4.2.4.2 beschrieben hergestellt. Als Inputkontrolle wurden 10 µl des Lysats abgenommen, mit 4x Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Das restliche Zelllysat wurde mit 500 µl Lysepuffer II aufgefüllt, der entsprechende Antikörper zugegeben ($IgG_{Kaninchen}$ 5 µg bzw. $Runx1_{Israel}$ 4 µl) und der Ansatz für 1-2 Stunden bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um die Bindung des Antikörpers an das Zielprotein zu ermöglichen. IgG diente als Kontrolle und sollte keine spezifische Bindung an das Zielprotein zeigen. Im Anschluss wurden 20 µl Protein G Sepharose 4 Fast Flow-Agarose-*beads* (GE Healthcare, Freiburg) in das Reaktionsgefäß gegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert, sodass

die Bindung des Antikörper-Protein-Komplexes an die Agarose *beads* erfolgen konnte. Am folgenden Tag wurden die Agarose *beads* viermal mit 500 µl Lysepuffer II gewaschen, anschließend in 4x Probenpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

4.2.4.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteinextrakte erfolgte mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE. Dabei werden die Proteine im pH-neutralen Sammelgel zunächst aufkonzentriert und anschließend im basischen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Vor Auftragung der Proteinlysate auf das Gel wurden diese für 5 min bei 95°C aufgekocht, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Vertikalelektrophoresekammer (SE 260, Hoefer Scientific, San Francisco, USA) für etwa 2,5 Stunden bei konstanter Spannung von 100 V. Als Molekulargewichtsstandard dienten 5 µl des Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt).

4.2.4.7 Westernblot und immunologische Detektion

Nach Auftrennung der Proteine mithilfe der SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham™ Hybond ECL, GE Healthcare, München) transferiert. Hierfür wurde die Membran gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 100 V und 4°C im Tankblot-Verfahren (Mini-TransBlot Cell, Bio-Rad, München). Die freien Bindungsstellen wurden nach dem Transfer der Proteine auf die Membran durch Inkubation mit Blockpuffer für 60 min bei RT besetzt. Anschließend wurde ein spezifischer Primärantikörper (vgl. Tabelle 1) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen und der zum Primärantikörper passende Sekundärantikörper für 60 min bei RT auf die Membran gegeben. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Membran in TBS-T. Da der Sekundärantikörper mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war, konnten die Antikörperbindungen unter Verwendung des Amersham ECL-Detection™ plus Kits (GE Healthcare, München) bzw. des SuperSignal® West Femto Trial Kits (Thermo Scientific, Darmstadt) jeweils nach Herstellerangaben mittels einer Chemilumineszenzreaktion detektiert werden.

5 Ergebnisse

Durch die Analyse des B6.*Runx1*$^{fl/fl}$-*VavCre* Mausmodells, in dem die Deletion von *Runx1* in den hämatopoetischen Stammzellen erfolgt, konnte gezeigt werden, dass die Expression von Runx1 nicht für die B-Zellspezifikation, sondern für die weitere Differenzierung der frühen Vorläuferzellen essentiell ist (Niebuhr et al., 2013). Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde in der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese ein weiteres konditionales *Runx1 knockout* Mausmodell (B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$) etabliert, in dem die Deletion von *Runx1* an die Aktivität des *Cd79a*-Promotors gekoppelt ist und daher erst in den späten CLPs, also in bereits B-Zell-restringierten Vorläuferzellen stattfindet. Dazu ist in diesem Mausmodell das Exon 4 des *Runx1*-Gens mit LoxP-Sequenzen flankiert (gefloxt). Durch gleichzeitige Expression der transgenen Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle des *Cd79a*-Promotors steht, wird das gefloxte Exon ausgeschnitten, sodass der Leserahmen des *Runx1*-Gens verschoben wird und kein funktionales Runx1-Protein entstehen kann. Der Vergleich beider Mausmodelle (*Vav-Cre* und *Cd79a-Cre*) ergab, dass unabhängig vom Zeitpunkt der *Runx1*-Deletion nahezu keine IgM exprimierenden B-Zellen detektiert werden konnten. Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte im Rahmen dieser Arbeit daher die Funktion des Transkriptionsfaktors Runx1 während der frühen B-Zellentwicklung genauer untersucht werden.

5.1 Charakterisierung des Differenzierungsblocks im B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodell sowie Identifizierung zugehöriger Runx1-Zielgene

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte zunächst der beobachtete Block in der B-Zelldifferenzierung mithilfe zusätzlicher durchflusszytometrischer Analysen anhand des B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodells genauer charakterisiert werden. Im weiteren Verlauf sind daher nur Analysen des B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodells dargestellt. Hierbei werden Mäuse, in denen *Runx1* deletiert ist, als *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ und Kontrollmäuse als *Runx1*$^{+/+}$ bezeichnet. Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse sollten weiterhin potentielle Zielgene von Runx1 hinsichtlich einer Rolle in den frühen B-Zellvorläufern untersucht und als direkte Runx1-Zielgene bestätigt werden.

5.1.1 Konditionales *Runx1 knockout* Mausmodell: Ein Verlust der Runx1-Funktion führt zu einem Differenzierungsblock im Prä-B-Zellstadium

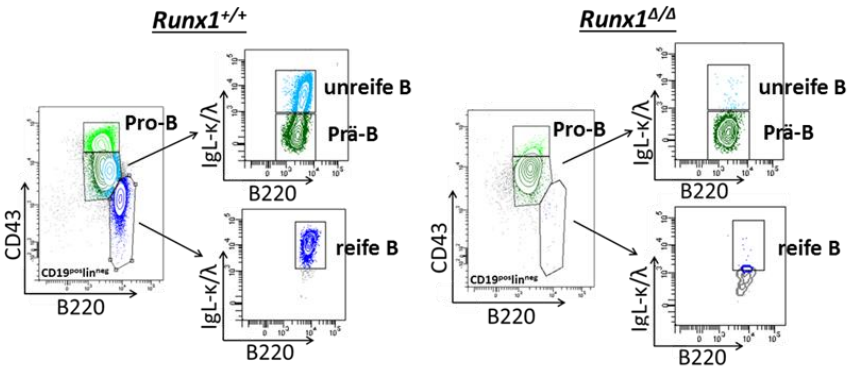
Aufgrund von zuvor angefertigten durchflusszytometrischen Analysen der *knockout* Mausmodelle wurde postuliert, dass der Block der B-Zelldifferenzierung bei Deletion von *Runx1* zwischen dem Pro-B- und dem Prä-B-Zellstadium zu finden ist. Da anhand der bis dahin verwendeten Kombination an Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren auf den Zellen jedoch die Trennung zwischen Pro-B-, Prä-B- und unreifen B-Zellen nicht so exakt zu bestimmen war, wurde in einem ersten Experiment die FACS-Strategie zur Analyse der B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ *knockout* Mäuse optimiert. Dazu wurde das Knochenmark aus *Runx1*$^{+/+}$ Mäusen

isoliert und verschiedene Kombinationen an Fluoreszenz-markierten Antikörpern getestet, die jeweils spezifische Oberflächenrezeptoren erkennen. In Abbildung 14A ist die optimierte FACS-Strategie anhand des Knochenmarks einer *Runx1*$^{+/+}$ sowie einer *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Maus im Vergleich dargestellt. Durch einen Antikörper-Mix (lin^{neg}) wurden in einem ersten Selektionsschritt zunächst alle nicht-B-Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen auf den B-Zellmarker CD19 hin untersucht und alle CD19-positiven Zellen mithilfe der weiteren B-zellspezifischen Marker genauer analysiert. So konnte die B-Zellpopulation der Kontrolltiere in Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen, unreife und reife B-Zellen unterteilt werden. Reife B-Zellen und unreife B-Zellen konnten dabei durch die Expression der leichten Kette des BZRs (IgL) von den früheren Vorläuferpopulationen abgegrenzt werden. Reife B-Zellen waren zudem im Gegensatz zu unreifen B-Zellen durch eine hohe B220-Expession und die fehlende Expression von CD43 gekennzeichnet (reife B: B220^{high}CD43^{-}IgL^{+}), während auf unreifen B-Zellen eine mittlere CD43-Expression detektiert werden konnte (unreife B: B220^{+}CD43^{+}IgL^{+}). Die Expression von CD43 konnte zudem genutzt werden, um die Pro-B- und Prä-B-Zellpopulation voneinander zu unterscheiden. Pro-B-Zellen wiesen eine deutlich höhere Expression auf (Pro-B: B220^{+}CD43^{high}IgL^{-}; Prä-B: B220^{+}CD43^{+}IgL^{-}). Zur weiteren Analyse der Prä-B-Zellpopulation wurde außerdem die Größe der Zellen betrachtet. Späte Prä-B-Zellen, die bereits in den Zellzyklusarrest eingetreten sind, sind dabei deutlich kleiner als die Zellen der frühen Prä-B- bzw. Pro-B-Zellpopulationen. Auch dieses konnte für die Kontrolltiere bestätigt werden (Abb. 14B). Die Auswertung der FACS-Analysen der *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäuse ergab zunächst einmal, dass die Anzahl der Vorläuferzellen im Vergleich zu *Runx1*$^{+/+}$ Mäusen deutlich reduziert war. Darüber hinaus wurden in *Runx1*-deletierten Mäusen nahezu keine reifen und unreifen Zellen im Knochenmark nachgewiesen, da weder eine hohe B220-Expression noch die Expression der leichten Kette des BZRs gezeigt werden konnten. Weiterhin wurde keine eindeutige Pro-B-Zellpopulation identifiziert, da die Expression des Oberflächenantigens CD43 im Vergleich zu den Kontrolltieren insgesamt niedriger war und eher dem Expressionsniveau der Prä-B-Zellpopulation entsprach (Abb. 14A). Die genauere Analyse der Größe der Zellen in der Pro-B/Prä-B-Population der *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäuse ergab zudem, dass diese im Gegensatz zu Zellen mit vergleichbarer CD43-Expression in Kontrolltieren deutlich größer waren und somit keine späten Prä-B-Zellen darstellten (Abb. 14B).

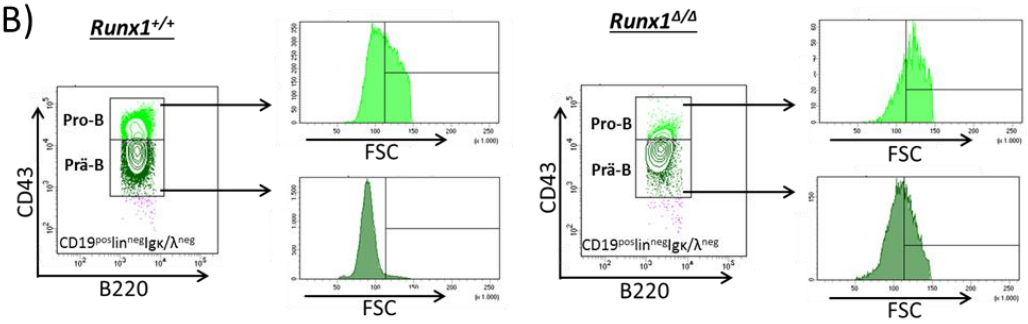
Zusammengefasst konnte anhand dieser durchflusszytometrischen Analysen festgestellt werden, dass in *Runx1*-deletierten Mäusen nahezu keine unreifen und reifen B-Zellen vorhanden sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die noch zu detektierenden Vorläuferzellen aufgrund niedriger CD43-Expression in Kombination mit der beobachteten Zellgröße eine aberrante Population aus Pro-B- und frühen Prä-B-Zellen darstellten. Späte Prä-B-Zellen konnten nicht identifiziert werden. Der Differenzierungsblock in der B-Zellentwicklung in diesem Mausmodell erfolgt demzufolge beim Übergang der frühen Prä-B- in späte Prä-B-Zellen (Abb. 14C).

A)

lin^{neg}	B-Zellmarker
CD4	CD19
CD5	CD43
CD11b	B220
Gr1	Igκ
NK1.1	Igλ
Ter119	



B)



C)

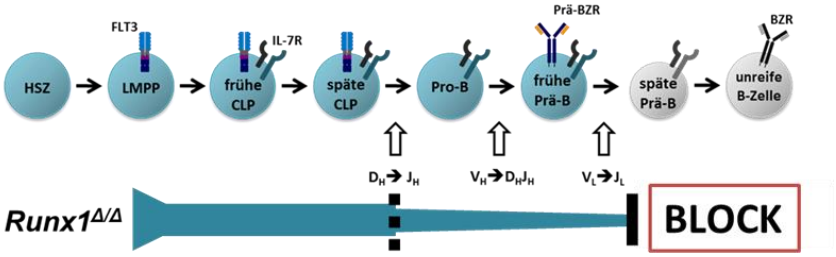


Abb. 14: Die Deletion von *Runx1* in späten CLPs führt zu einem Block der Differenzierung in der Prä-B-Zellpopulation.
A) FACS-Strategie zur Analyse der verschiedenen B-Zellpopulationen im Knochenmark. Alle untersuchten Populationen sind lin^{neg}CD19^{+}: Pro-B (B220^{+}CD43^{high} Igκ/λ^{-}), Prä-B (B220^{+}CD43^{+}Igκ/λ^{-}), unreife B (B220^{+}CD43^{+}Igκ/λ^{+}), reife B (B220^{high}CD43^{-} Igκ/λ^{+}). Dargestellt sind exemplarisch die FACS-Analysen der B-Zellpopulationen im Knochenmark einer *Runx1*$^{+/+}$ und einer *Runx1*$^{Δ/Δ}$ Maus. **B)** Durchflusszytometrische Analyse der Pro-B- und Prä-B-Zellpopulation (CD19^{+}Lin^{neg} Igκ/λ^{neg}) aus dem Knochenmark einer *Runx1*$^{+/+}$ und einer *Runx1*$^{Δ/Δ}$ Maus im Hinblick auf die Zellgröße (FSC). **C)** Schematische Darstellung des Blocks in der B-Zelldifferenzierung im B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodell. Der Verlust von Runx1 führt zu einer deutlichen Reduktion an Vorläuferzellen ab dem Pro-B-Zellstadium und zu einem Differenzierungsblock beim Übergang in späte Prä-B-Zellen.

5.1.2 Die Runx1-Zielgene werden differentiell exprimiert

Um potentielle Zielgene von Runx1 zu identifizieren, die bei Deregulation durch fehlende Runx1-Expression zum oben beschriebenen Block in der B-Zelldifferenzierung beitragen könnten, wurden bereits zuvor Genexpressionsstudien in Form von Mikroarray-Analysen durchgeführt. Die durch Runx1 regulierten Gene in einem Funktionsverlustmodell (*Runx1*$^{Δ/Δ}$ Pro-B/Prä-B-Zellen) wurden dazu mit Runx1-regulierten Genen in einem Runx1-Überexpressionsmodell verglichen und so ein Repertoire von 40 potentiellen Runx1-Zielgenen erhalten (Kriebitzsch, Masterarbeit 2011). Diese Gene sollten in der hier vorliegenden Arbeit genauer analysiert werden. Interessanterweise konnten zwei

Gruppen von Zielgenen identifiziert werden, deren Funktionen stromabwärts des Prä-B-Zellrezeptors (Prä-BZRs) bzw. des IL-7-Rezeptors (IL-7Rs) lokalisiert sind. Die eine Gruppe umfasst Mitglieder der Lyn-Subfamilie der Src-Kinasen, während die andere die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B beinhaltet. Zur Bestätigung dieser Gene als Runx1-Zielgene wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Pro-B-/Prä-B-Zellpopulationen aus dem Knochenmark von *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ und *Runx1*$^{+/+}$ Mäusen mittels FACS-Sortierung isoliert, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der relativen Expressionsänderungen bestätigte, dass Runx1 für diese Gene als transkriptioneller Aktivator zu wirken scheint. In Abbildung 15A sind die relativen Expressionslevel der Zielgene dargestellt. In *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäusen betrug die Expression aller betrachteten Gene, abgesehen von der Expression von *Lck*, nicht einmal 10% der Expression, die in *Runx1*$^{+/+}$ Mäusen detektiert werden konnte. Doch auch die Expression von *Lck* war in den *Runx1*-deletierten Mäusen deutlich reduziert und betrug lediglich 30% der Expression, die in Kontrolltieren festgestellt werden konnte.

Anschließend sollte in einem weiteren Experiment die Expression der Runx1-Zielgene während der frühen B-Zellentwicklung untersucht werden. Hierfür wurden Pro-B-, Prä-B- sowie unreife B-Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6J Mäusen mittels FACS-Sortierung isoliert und wie im vorherigen Versuch die relativen Expressionslevel der Gene in den unterschiedlichen B-Zellvorläufern mithilfe von qRT-PCR-Analysen bestimmt. Die Expression der hauptsächlich in B-Zellen exprimierten Src-Kinasen Blk und Hck nahm beim Übergang vom Pro-B- zum Prä-B-Stadium zu. Dabei war die Zunahme der Expression von *Hck* (16-fach höher) deutlich stärker als der Anstieg der Expression von *Blk* (5-fach höher). Die Expression der T-zellspezifischen Src-Kinase Lck hingegen blieb im Verlauf der frühen B-Zelldifferenzierung konstant (Abb. 15B). Auch die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B, durch *Ikzf3* und *Spib* kodiert, war in den Prä-B-Zellen deutlich erhöht. Beide Gene zeigten bezogen auf die Expressionslevel in Pro-B-Zellen eine ungefähr 10-fach stärkere Expression in Prä-B-Zellen. Im Vergleich dazu konnte keine erhöhte Expression von *Runx1* in den verschiedenen Vorläuferpopulationen detektiert werden (Abb. 15B).

Zur Bestätigung wurden diese Ergebnisse mit Genexpressionsdaten der ImmGen-Datenbank (Heng et al., 2008) verglichen (Abb. 15C). Auch diese Daten zeigten den spezifischen Anstieg der Expression der Runx1-Zielgene *Blk* und *Hck* sowie *Ikzf3* und *Spib* während der frühen B-Zelldifferenzierung. Im Vergleich zu den qRT-PCR-Analysen konnte anhand dieser Daten zusätzlich auch die Expression der Gene in frühen und späten Prä-B-Zellen unterschieden werden. So zeigten *Hck* und *Spib* spezifisch im späten Prä-B-Zellstadium einen deutlichen Anstieg in ihrer Expression, während *Ikzf3* bereits im frühen Prä-B-Zellstadium verstärkt transkribiert wird und die Expression in späten Prä-B-Zellen noch einmal stark zunimmt (Abb. 15C).

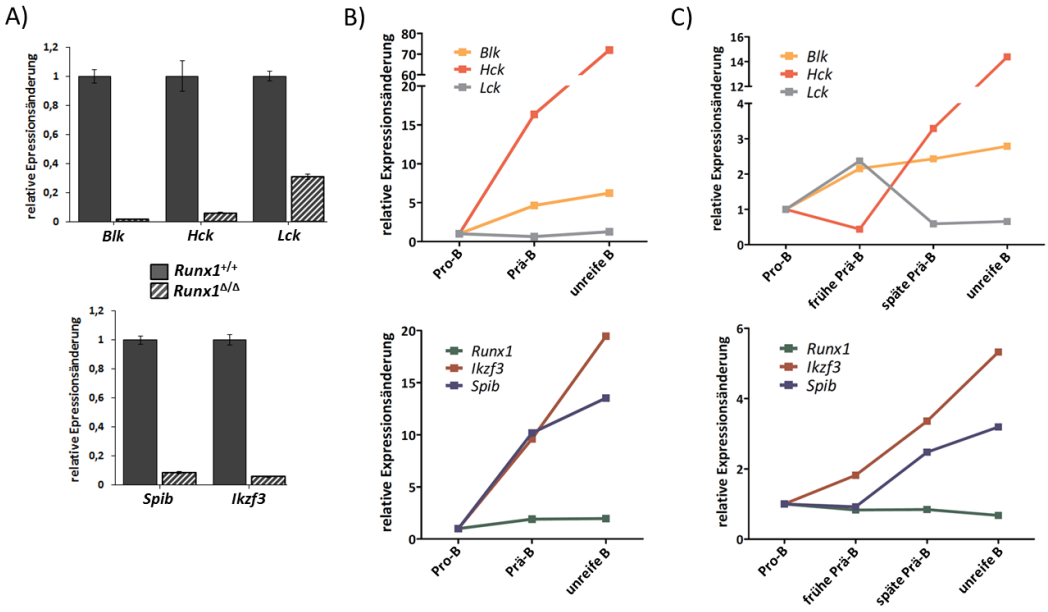


Abb. 15: Wichtige Zielgene von Runx1 werden in der frühen B-Zellentwicklung differentiell exprimiert.
A) Vergleich der relativen Expressionslevel der Runx1-Zielgene in *Runx1*$^{+/+}$ und *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäusen mithilfe von qRT-PCR. Für die Analyse wurde die Pro-B-/Prä-B-Zellpopulation mittels FACS-Analyse aus dem Knochenmark isoliert und mRNA hergestellt. Für die Normalisierung der einzelnen cDNA-Proben wurden die Expressionslevel von *Hrpt* bestimmt. **B)** qRT-PCR-Analysen der Expressionsänderung verschiedener Lyn-Src-Kinasen und Transkriptionsfaktoren während der B-Zellentwicklung. Für die Isolierung der einzelnen B-Zellpopulationen aus C57BL/6J Mäusen wurde die unter 5.1.1 angegebene FACS-Strategie verwendet. Für die Normalisierung der cDNA-Proben wurden die Expressionslevel von *Hprt* bestimmt. **C)** Dargestellt ist die relative Expressionsänderung verschiedener Lyn-Src-Kinasen und Transkriptionsfaktoren während der frühen B-Zellentwicklung anhand der Genexpressionsdaten der ImmGen-Datenbank (Karolchik et al., 2004; Heng et al., 2008).

Zusammenfassend konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, dass die Expression der betrachteten Gene spezifisch in den Prä-B-Zellpopulationen hoch reguliert wird und dass dies in B-Zellvorläufern ohne Runx1-Expression nicht möglich ist. Die transkriptionelle Aktivität von Runx1 in Prä-B-Zellen scheint demnach für die verstärkte Expression der hier untersuchten Zielgene essentiell zu sein. Aufgrund der ImmGen-Expressionsdaten kann darüber hinaus postuliert werden, dass die erhöhte Expression von *Ikzf3* und *Spib* sowie von *Hck* nach Aktivierung der Prä-BZR-Signaltransduktion in den frühen Prä-B-Zellen stattfindet.

5.1.3 Analyse direkter Runx1-Zielgene in frühen B-Zellvorläufern

Zur Bestätigung der oben identifizierten Runx1-regulierten Gene als direkte Zielgene von Runx1 sollten in einem nächsten Experiment mithilfe von ChIP-Sequenzierungen (ChIP-seq) die Bindungsstellen von Runx1 durch eine genomweite Analyse untersucht werden. Dafür wurde ein Zellsystem verwendet, das die gezielte Induktion einer Runx1-Überexpression ermöglichte.

5.1.3.1 Induzierbare Überexpression von RUNX1 in einer Pro-B-Zelllinie

RUNX1 wird in diesem Modell als Fusionsprotein zusammen mit einer mutierten Form der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ERt2) exprimiert. Bei Überexpression dieses Fusionsproteins in unbehandelten Zellen bewirkt die Interaktion von ERt2-Domäne und Chaperonen den Verbleib des Fusionsproteins im Zytoplasma der Zellen. Bei Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) bindet 4-OHT allerdings als Ligand an die ERt2-Domäne und die Chaperone dissoziieren vom Fusionsprotein. So kann das Fusionsprotein in den Zellkern translozieren und RUNX1 als Transkriptionsfaktor an seine Zielgene binden. In dieser Arbeit sollte die Pro-B-Zelllinie BMiFLT3, die durch eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors gekennzeichnet ist, für das induzierbare System genutzt werden. Um zu bestätigen, dass die Translokation des Fusionsproteins auch in den hier verwendeten BMiFLT3-Zellen stattfindet, wurden diese zunächst mit dem für das Fusionsprotein kodierenden γ-retroviralen Vektor transduziert und der Anteil an transduzierten Zellen mittels FACS-Analyse sortiert (Abb. 16A). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 0,2 µM 4-OHT bzw. mit Ethanol (Kontrolle) für 24 Stunden, bevor aus diesen Ansätzen Kern- und Zytoplasmalysate hergestellt und diese mittels Westernblot-Analyse untersucht wurden (Abb. 16B). Anhand der Proteinexpression konnte die Translokation des RUNX1-Fusionsproteins in den Zellkern erst nach Zugabe von 4-OHT auch in dem hier verwendeten Pro-B-Zellsystem bestätigt und die Zellen somit für die weiteren Analysen verwendet werden.

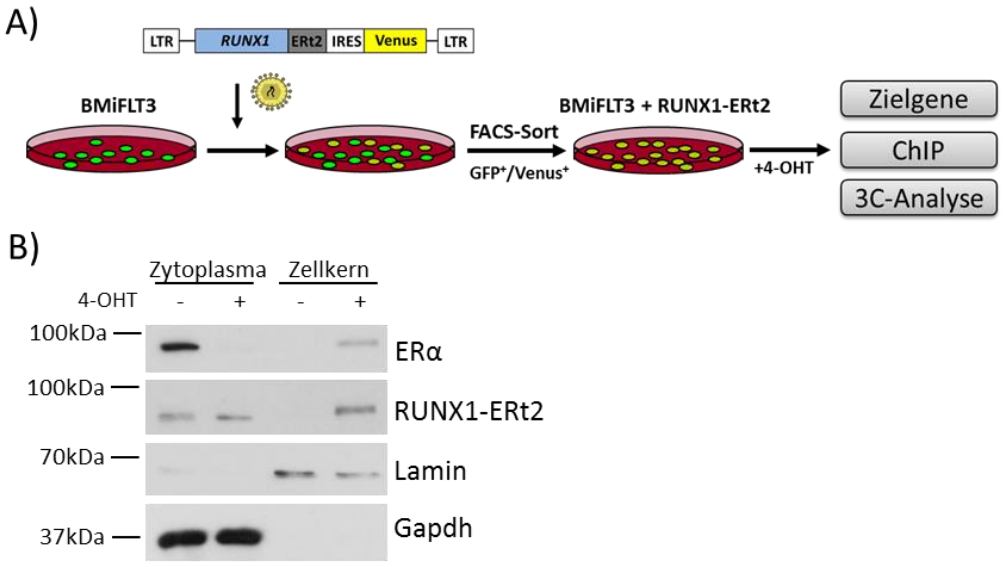


Abb. 16: Das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein translozierte nach 4-OHT-Zugabe in den Zellkern.
A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. BMiFLT3-Zellen wurden mithilfe eines γ-retroviralen Vektors, der für ein RUNX1-ERt2-Fusionsprotein kodierte, transduziert und der Anteil an transduzierten Zellen mittels FACS-Analyse sortiert. Diese Zellen dienten anschließend als Ausgangszelllinie für weitere Versuche. **B)** RUNX1-ERt2-überexprimierende BMiFLT3-Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne 4-OHT kultiviert, anschließend die Proteine in Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert und mithilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion des Fusionsproteins (82 kDa) wurde ein ERα- und ein Runx1-spezifischer Antikörper verwendet. Zur Kontrolle der Proteinmenge und der Fraktionierung der Zelllysate wurden Antikörper gegen Lamin (67 kDa) bzw. Gapdh (37 kDa) eingesetzt. Das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein konnte erst nach Zugabe von 4-OHT im Zellkern detektiert werden.

5.1.3.2 Identifizierung direkter Runx1-Zielgene mittels Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen: Runx1 bindet bevorzugt an *Enhancer*-Bereiche in der DNA

Für die Analyse der genomweiten Runx1-Bindungsstellen wurden die mit dem RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transduzierten Zellen zunächst für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT behandelt. Die anschließende Zugabe von Formaldehyd bewirkte die Quervernetzung von DNA und Proteinen. Durch Lyse der Zellen und Sonifizierung der isolierten DNA wurden kurze DNA-Stücke erhalten, die weiterhin mit den Proteinen assoziiert waren. Daher erfolgte im nächsten Schritt die Immunpräzipitation (IP) der DNA-Protein-Komplexe durch Zugabe eines Runx1-spezifischen Antikörpers und Protein-G-Agarose *beads*. Im Kontrollansatz wurde die IP mit einem unspezifischen IgG-Protein durchgeführt. Nach Aufreinigung der präzipitierten DNA-Abschnitte wurden beide Ansätze im Hochdurchsatzverfahren sequenziert (Abb. 17A). Die hierbei erhaltenen *reads*, also alle bei der Sequenzierung erhaltenen kurzen DNA-Sequenzen, wurden mit dem Mausgenom aligniert. So konnten Regionen im Genom identifiziert werden, die im Vergleich zu anderen Regionen mehrfach sequenziert wurden, d.h. zuvor durch die IP angereichert waren. Durch zusätzlichen Abgleich der Sequenzierungsdaten der Runx1-spezifischen IP und der Kontroll-IP wurden schließlich die Runx1-gebundenen DNA-Abschnitte (sogenannte *peaks*) identifiziert. In der hier durchgeführten Analyse konnten 6792 Runx1-spezifische *peaks* gefunden werden, die 4327 Gen-Loci zugeordnet werden konnten.

Um genauere Daten darüber zu erhalten, wie Runx1 seine Zielgene reguliert, durch Bindung an proximale Promotorelemente oder an distal liegende *Enhancer*-Bereiche, wurden die identifizierten *peaks* hinsichtlich ihrer relativen Lokalisation zum nächst gelegenen Gen untersucht (Abb. 17B). Dazu wurde die Lokalisation der Runx1 *peaks* in zwei unterschiedlichen Gen-Kohorten miteinander verglichen. Die verwendeten Gene wurden dabei anhand der zuvor analysierten Mikroarray-Daten der *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäuse und des induzierbaren RUNX1-ERt2-Überexpressionssystems zusammengestellt (Kriebitzsch, Masterarbeit 2011). 39% der durch Runx1 regulierten Gene (n=1091) wiesen demnach Runx1-Bindungsstellen auf, die innerhalb eines Bereiches von 10 kb stromaufwärts bzw. stromabwärts des Gens oder innerhalb der Gengrenzen lagen. Demgegenüber zeigte die Analyse von Kontrollgenen (n=8703), die zwar in Pro-B-Zellen exprimiert, jedoch nicht durch Runx1 reguliert werden, das hier nur knapp 25% der Gene Runx1-Bindungsstellen innerhalb der oben genannten Bereiche aufwiesen. Ein großer Anteil der Runx1-regulierten Gene war zudem durch noch weiter entfernt liegende Runx1-Bindungsstellen gekennzeichnet (34%).

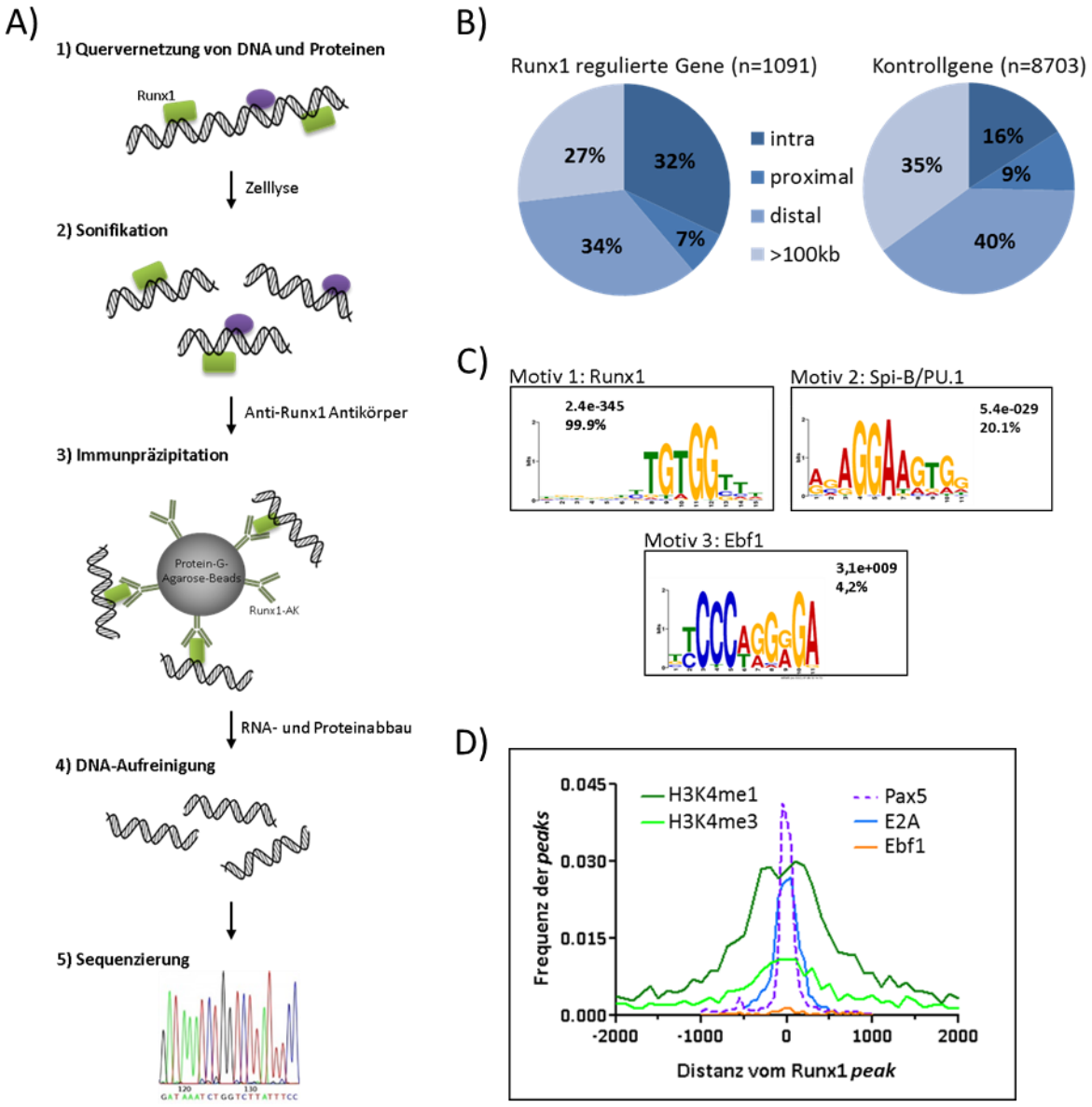


Abb. 17: Genomweite Analyse der Runx1-Bindungsstellen in einer Pro-B-Zelllinie mit induzierbarer RUNX1-Überexpression.

A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Zunächst wurden DNA und Proteine durch Zugabe von Formaldehyd quervernetzt, bevor durch Sonifikation das Scheren der DNA in kleine Abschnitte erfolgte. Für die Immunpräzipitation wurde ein Runx1-spezifischer Antikörper oder IgG als Kontrolle sowie Protein-G-Agarose beads zu den Ansätzen hinzugefügt. Die im Anschluss aufgereinigten DNA-Fragmente wurden im letzten Schritt mithilfe von Hochdurchsatzverfahren sequenziert. **B)** Dargestellt ist die Verteilung der Runx1-gebundenen Regionen in Bezug auf Runx1-regulierte Gene. Bei Vergleich mit einem Repertoire von Kontrollgenen konnte für die Runx1-regulierten Gene eine Anreicherung von Runx1 *peaks* in der Nähe dieser Gene gezeigt werden. Für diese Analyse wurde jeweils der zu einem Gen nächstgelegene *peak* identifiziert, zum einen in einer Kohorte von Kontrollgenen und zum anderen in einem Set an Runx1-regulierten Genen, die anhand der zuvor durchgeführten Genexpressionsstudien gefunden worden waren. Je nach Lokalisation wurden diese *peaks* eingeteilt als 1) intra-gen: zwischen den Gengrenzen, 2) proximal: maximal 10 kb stromaufwärts oder -abwärts der Gengrenzen, 3) distal: maximal 100 kb stromaufwärts oder -abwärts der Gengrenzen, oder 4) >100 kb der Gengrenzen. **C)** Übersicht über die bei der *de novo* Motivsuche identifizierten angereicherten Sequenzen nahe der Runx1-Bindungsstellen. Neben der Frequenz der angereicherten DNA-Motive, die in der Nähe (+/- 75 bp) der Runx1 *peaks* (n=500) gefunden wurden, ist auch der E-Value angegeben. **D)** Dargestellt ist die Frequenz der Runx1 *peaks* in Abhängigkeit vom Abstand zu den *peaks* anderer B-zellspezifischer Transkriptionsfaktoren (Pax5, E2A und Ebf1) oder zu Histonmodifikationen (H3K4me1 und H3K4me3).

Durch eine Analyse von *de novo* DNA-Bindungsmotiven anderer B-zellspezifischer Transkriptionsfaktoren in der Nähe der identifizierten Runx1 *peaks* sollten Hinweise auf mögliche Kooperationspartner von Runx1 in frühen B-Zellvorläufern gefunden werden. Hierzu wurden die flankierenden Sequenzen von 500 zufällig ausgewählten Runx1 *peaks* hinsichtlich solcher *de novo* Motive untersucht (Abb. 17C). Tatsächlich zeigten 99,9% der untersuchten Runx1-Bindungsstellen das Runx1 DNA-Bindungsmotiv, wodurch die Zuverlässigkeit dieser Analyse festgestellt werden konnte. Weiterhin wiesen 20% der Runx1-Bindungsstellen DNA-Bindungsmotive für die Spi-B/PU.1-Subfamilie der ETS-Transkriptionsfaktoren auf. Auch das Bindungsmotiv für Ebf1, einen weiteren B-zellspezifischen Transkriptionsfaktor, konnte identifiziert werden, jedoch in nur 4% der untersuchten Runx1-Bindungsstellen. Dieses Ergebnis konnte zudem durch den Vergleich mit einer bereits publizierten Studie, in der die genomweiten Ebf1-Bindungsstellen in Pro-B-Zellen analysiert wurden, bestätigt werden (Lin et al., 2010). Nur 2,6% der Runx1-Bindungsstellen zeigten 500 bp stromaufwärts bzw. -abwärts eine Ko-Lokalisation mit Ebf1-Bindungsstellen. Durch Vergleich mit weiteren bereits veröffentlichen Studien konnte zudem festgestellt werden, dass 17% der Runx1 *peaks* E2A-Bindungsstellen (Lin et al., 2010) und 22% Bindungsstellen für Pax5 (Revilla et al., 2012) in der Nähe aufwiesen (Abb. 17D). Die Betrachtung von Histonmodifizierungen in Pro-B-Zellen (Lin et al., 2010) in der Nähe von Runx1 *peaks* zeigte darüber hinaus, dass etwa 25% der Runx1-Bindungsstellen durch monomethyliertes Lysin 4 in Histon 3 (H3K4me1), ein Charakteristikum aktiver *Enhancer*-Regionen, gekennzeichnet waren. Die Frequenz der Ko-Lokalisation von Runx1-gebundenen Regionen und Histonmodifizierungen, die aktive Promoterbereiche markieren (H3K4me3), war demgegenüber deutlich geringer (Abb. 17D).

Bei genauerer Betrachtung der Gen-Loci der unter 5.1.2 identifizierten Runx1-Zielgene konnte sowohl für *Blk*, *Hck* und *Lck* als auch für *Ikzf3* und *Spib* anhand der hier durchgeführten ChIP-Analyse die direkte Bindung von Runx1 bestätigt werden (Abb. 18). Alle Gene zeigten dabei mindestens eine Runx1-Bindungsstelle, die durch eine Ko-Lokalisation mit E2A, sowie durch die Histonmodifizierung H3K4me1 und DNaseI-hypersensitive Bereiche in der DNA gekennzeichnet waren, was auf aktive *Enhancer*-Regionen hinweisen könnte. Zusätzlich konnte in der Nähe fast aller dieser Runx1 *peaks* auch eine Pax5-Bindungsstelle gefunden werden. In den Gen-Loci, die für die Src-Kinasen Blk und Lck kodieren, konnten des Weiteren Runx1-Bindungsstellen in den proximalen Promotorbereichen der Gene identifiziert werden. Übereinstimmend damit waren diese Regionen durch die Histonmodifizierung H3K4me3 charakterisiert, die aktive Promotorregionen kennzeichnet.

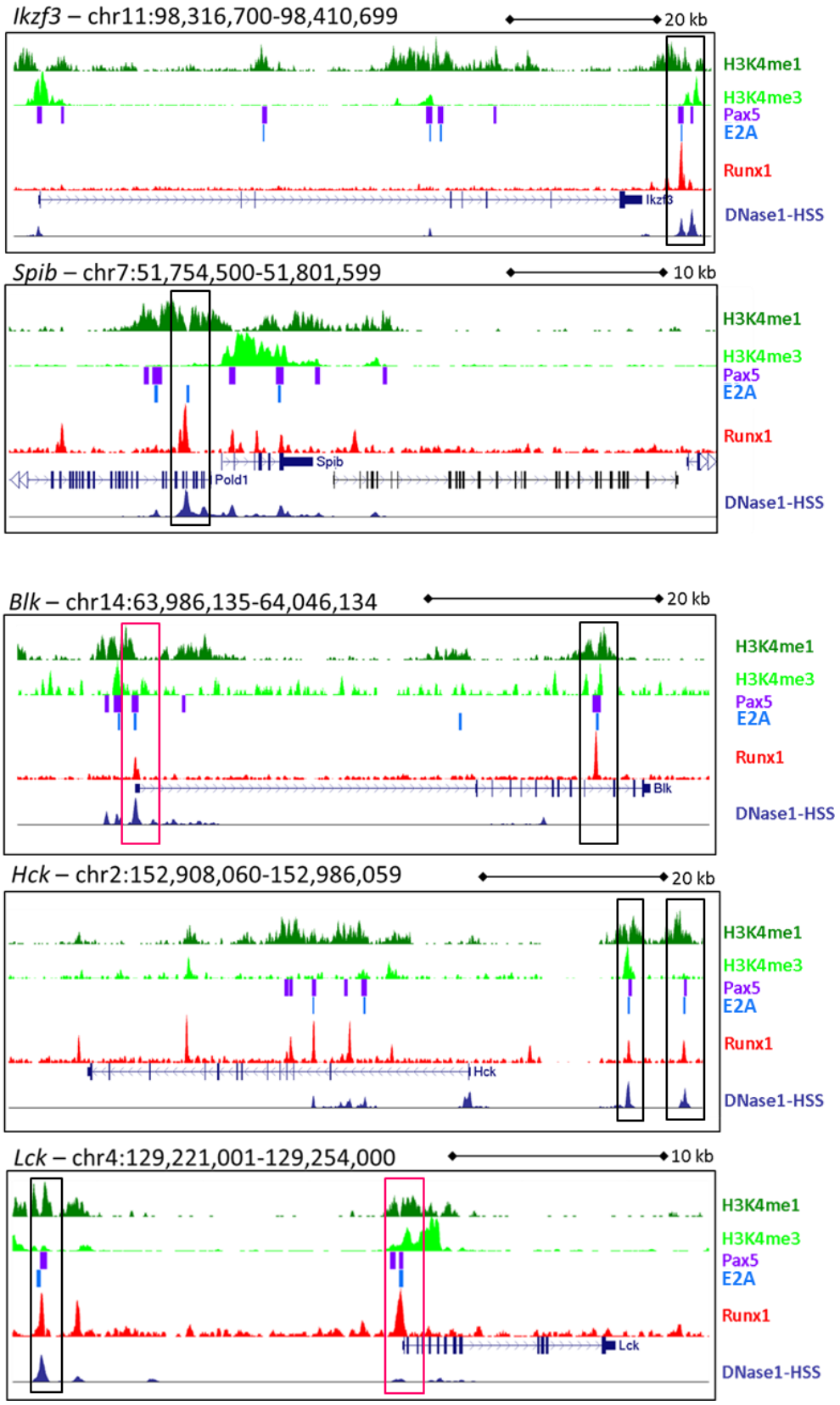


Abb. 18: Detaillierte Betrachtung der Runx1-Bindungsstellen in den genomischen Loci ausgewählter Runx1-Zielgene.
Zu sehen sind die Bindungsstellen von Runx1 in den genomischen Loci von *Ikzf3* und *Spib* sowie von *Blk*, *Hck* und *Lck*. Die Ko-Lokalisation mit anderen B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie E2A und Pax5 ist deutlich zu erkennen, ebenso wie charakteristische H3K4me-Modifikationen und DNA-hypersensitive Stellen in der Nähe der Runx1 *peaks*. Für die Darstellung wurde der UCSC (*University of California* – Santa Cruz) *Genome Browser* (Kent et al., 2002; Karolchik et al., 2004) genutzt. Die schwarzen Rechtecke markieren potentielle *Enhancer*-Regionen, während die Magenta-farbenden Rechtecke potentielle Promoter-Bereiche kennzeichnen.

In der Summe konnten anhand der ChIP-Studien Bindungsstellen von Runx1 in 4300 Gen-Loci gefunden werden und darüber hinaus die direkte Bindung an die in dieser Arbeit näher betrachteten Zielgene bestätigt werden. Diese Bindungsstellen waren dabei durch Ko-Lokalisation mit anderen B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren sowie durch DNA-hypersensitive Stellen und spezifische Histonmodifizierungen, die charakteristisch für aktive *Enhancer*-Elemente sind, gekennzeichnet.

5.2 Analyse der *Enhancer*-Promotor-Interaktionen im *Ikzf3*-Locus

Anhand der zuvor durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass Runx1 die Expression seiner Zielgene vor allem durch Bindung an *Enhancer*-Elemente zu regulieren scheint. Diese Bindung sowie Interaktionen mit weiteren Ko-Faktoren können die Struktur verschiedener Abschnitte eines Chromosoms direkt beeinflussen und zum sogenannten *Looping* der DNA führen, wodurch eigentlich weit voneinander entfernt gelegene *Enhancer*- und Promotorbereiche in räumliche Nähe gebracht werden können (Abb. 19A). Ob auch die Bindung von Runx1 eine solche Konformationsänderung beeinflusst sollte am Beispiel des *Ikzf3*-Locus mithilfe einer 3C (*chromosome confirmation capture*) Analyse untersucht werden. Für diesen Genbereich konnte aufgrund der vorherigen Experimente eine Runx1-Bindungsstelle etwa 90 kb stromabwärts der Transkriptionsstartstelle von *Ikzf3* identifiziert werden, die zudem eine Ko-Lokalisation mit anderen Transkriptionsfaktoren sowie Ko-Aktivatoren aufwies und durch H3K4me1-Histionmodifizierungen gekennzeichnet war (Abb. 19B). Die Durchführung der 3C-Analyse war durch vier Schritte charakterisiert (Abb. 19C): zunächst erfolgte die Quervernetzung von DNA und Proteinen und die Lyse der Zellen. In einem weiteren Schritt wurde dem Ansatz eine geeignete Restriktionsendonuklease zugefügt und anschließend die freien DNA-Enden wieder zusammengefügt, wobei bevorzugt nah beieinander liegende DNA-Enden ligieren sollten. Die hierbei entstandenen PCR-Produkte wurden in einem letzten Schritt mittels TaqMan-basierter qRT-PCR quantitativ analysiert. So sollten aufgrund spezifischer Interaktionen bestimmter DNA-Abschnitte eventuell angereicherte Ligationsprodukte identifiziert werden. Die 3C-Analyse erfolgte in der mit dem RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transduzierten Pro-B-Zelllinie BMiFLT3. Die Zellen wurden hierfür 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT behandelt, sodass die Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern und dessen Bindung an die DNA erfolgen konnte. Als Restriktionsendonuklease wurde in diesem Ansatz HindIII verwendet. Für den *Ikzf3*-Locus sind in Abbildung 19D die vorhandenen Restriktionsschnittstellen und die für die qRT-PCR-Analysen designten Primer sowie potentielle und bestätigte Runx1-Bindungsstellen dargestellt. Anhand dieser 3C-Analyse sollten so mögliche Interaktionen zwischen dem DNA-Fragment, das die Runx1-Bindungsstelle aufwies und den anderen DNA-Abschnitten, die durch die Restriktion mit HindIII entstanden, untersucht werden.

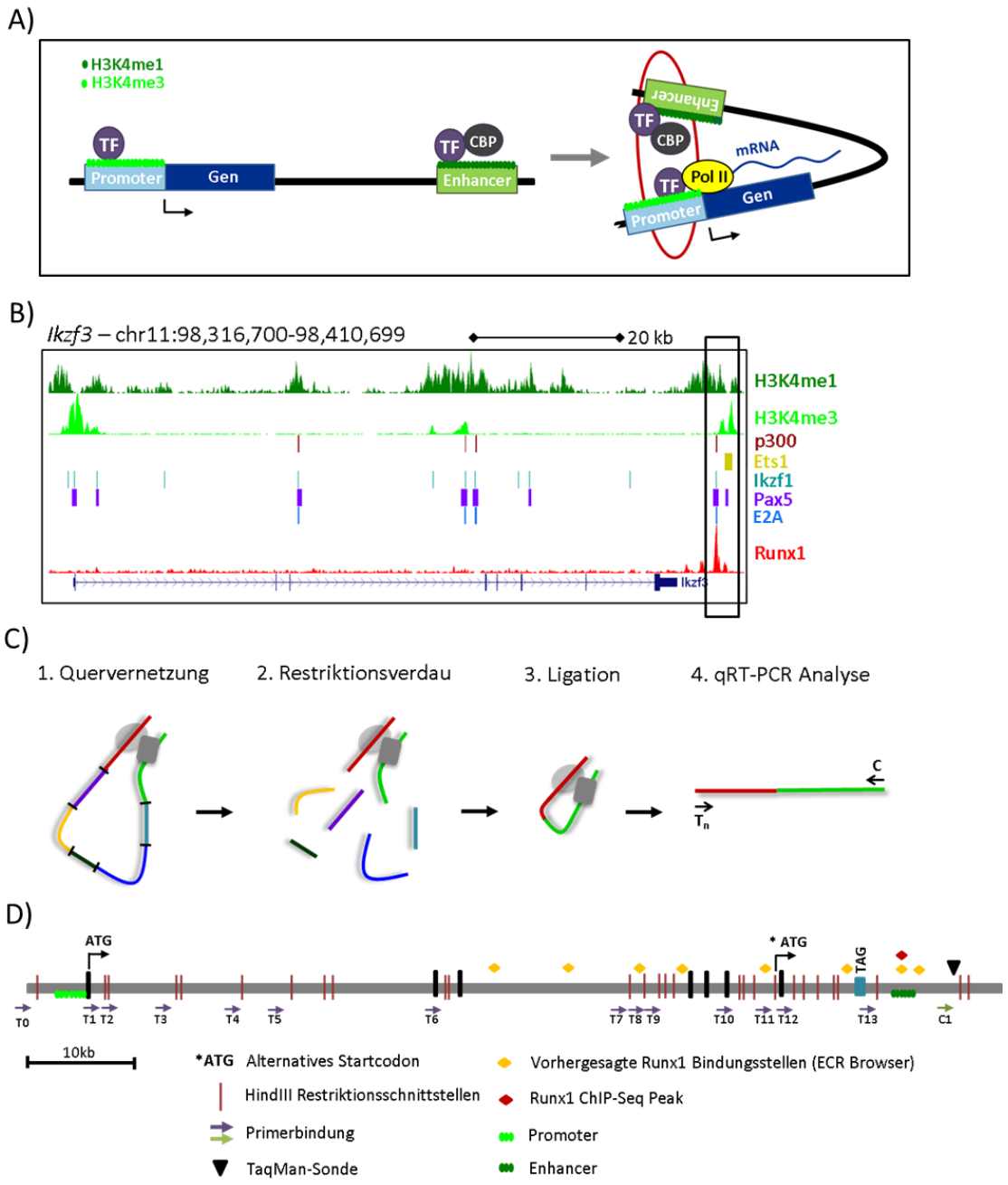


Abb. 19: Interaktionen von Promotor- und *Enhancer*-Elementen können mithilfe der 3C-Analyse untersucht werden.
A) Schematische Darstellung des DNA-*Loopings*. Durch das Zusammenwirken verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) und weiterer Bindungspartner (CPB) können durch Konformationsänderungen der DNA *Enhancer*- und Promotorregionen miteinander interagieren und so die Transkription spezifischer Genbereiche reguliert werden. **B)** Dargestellt ist die Bindung verschiedener B-zellspezifischer Transkriptionsfaktoren und weiterer Ko-Faktoren im Genlocus für *Ikzf3*. Die Bindungsstelle für Runx1 liegt etwa 90 kb stromabwärts der Transkriptionsstartstelle und weist eine Reihe von Ko-Lokalisationen mit anderen Faktoren auf. Für die Darstellung wurde der UCSC (*University of California* – Santa Cruz) *Genome Browser* (Kent et al., 2002; Karolchik et al., 2004) genutzt. Das schwarze Rechteck markiert den potentiellen Enhancer-Bereich. **C)** Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung der 3C-Analyse. Nach Quervernetzung von DNA und Proteinen erfolgten der Restriktionsverdau mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease und die anschließende Ligation nah beeinander liegender freier DNA-Enden. Im letzten Schritt wurde eine mögliche Anreicherung einzelner Ligationsprodukte mithilfe von qRT-PCR analysiert. **D)** Skizze des *Ikzf3*-Genlocus. Aufgeführt sind die für die 3C-Analyse wichtigen HindIII-Schnittstellen sowie die zur Analyse designte TaqMan-Sonde und die zugehörigen Primer.

Um die Verlässlichkeit der 3C-Analyse zu gewährleisten, mussten einige Kontrollversuche durchgeführt werden. In einem ersten Kontrollexperiment wurde die Effizienz des Restriktionsverdaus für die erhaltenen DNA-Fragmente mithilfe von qRT-PCR-Analysen bestimmt (Abb. 20A). Dazu wurden Proben der genomischen DNA, die vor und nach dem Restriktionsverdau aus dem Ansatz entnommen wurden, miteinander verglichen. Da der überwiegende Anteil der DNA-Fragmente eine Restriktionseffizienz von über 80% aufwies, konnte im nächsten Schritt die Ligation der DNA-Abschnitte stattfinden. Nach Aufreinigung dieser DNA wurde in einem weiteren Kontrollexperiment die Qualität der erhaltenen DNA bestimmt, indem Verdünnungen des Ansatzes hergestellt und mittels qRT-PCR-Analysen der beobachtete mit dem erwarteten Verdünnungsfaktor verglichen wurde. Es konnte eine ausreichende Reinheit der DNA-Probe bestätigt werden (Abb. 20B). Folglich konnten im Anschluss die Interaktionsfrequenzen der einzelnen DNA-Fragmente mithilfe der qRT-PCR-Analysen bestimmt werden. Hierbei war es wichtig, dass nicht nur die Interaktionsfrequenzen von Promotor- und *Enhancer*-Bereich, sondern auch eine Reihe weiterer Interaktionsfrequenzen zwischen anderen Fragmenten des *Ikzf3*-Locus analysiert wurden, um die Stärke einer biologisch relevanten Interaktionsfrequenz abschätzen zu können. In diesem Versuchsaufbau wurde dazu die Interaktionsfrequenz der Runx1-gebundenen *Enhancer*-Region mit 14 verschiedenen DNA-Abschnitten (T0-T13) des *Ikzf3*-Locus bestimmt. Insgesamt wurde die 3C-Analyse dreimal unabhängig voneinander wiederholt, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Zum Vergleich der Daten erfolgte die Normalisierung anhand von zwei verschiedenen Methoden (Abb. 20C). Durch die Bestimmung von Kontroll-Interaktionsfrequenzen innerhalb des *Ercc3*-Locus, der keine Runx1-Bindung aufwies, sollten mögliche Unterschiede der Quervernetzungen von DNA und Protein bzw. Unterschiede in den Restriktionseffizienzen der einzelnen 3C-Proben normalisiert werden. Eine weitere Normalisierung erfolgte durch eine interne Ladungskontrolle, indem das Expressionslevel von *Gapdh* in den einzelnen 3C-Proben bestimmt wurde. In Abbildung 20C ist eine der 3C-Analysen beispielhaft für alle durchgeführten Analysen dargestellt. Es konnte anhand der erhaltenen Daten eine signifikant erhöhte Interaktionsfrequenz der Runx1-gebunden *Enhancer*-Region mit dem DNA-Fragment T2, welches im ersten Intron des *Ikzf3*-Gens lokalisiert ist, festgestellt werden.

Zusammengefasst könnte demnach die Bindung von Runx1 an den distal gelegenen *Enhancer* ein *Looping* dieses DNA-Bereichs bewirken, wobei durch Interaktion mit weiteren Ko-Faktoren die Initiation der Transkription am Promotorbereich von *Ikzf3* direkt beeinflusst werden könnte (Abb. 20D). Damit stellt dies einen möglichen Mechanismus dar, wie Runx1 auch durch Bindung an *Enhancer*-Elemente die Transkription seiner Zielgene direkt regulieren könnte.

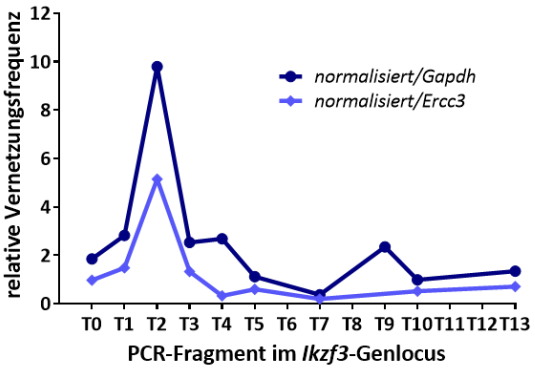
A)

	Restriktionseffizienz
Fragment T1	95,20
Fragment T2	83,96
Fragment T3	93,77
Fragment T4	93,04
Fragment T5	93,86
Fragment T6	49,48
Fragment T7	45,10
Fragment T8	89,00
Fragment T9	91,19
Fragment T10	90,23
Fragment T11	91,78
Fragment T12	54,15
Fragment T13	89,16

B)

		A (1)	A (0.5)	A (0.25)
b (Achsenabschnitt)		33,08	33,08	33,08
a (Steigung)		-3,68	-3,68	-3,68
Ct		34,92	35,98	37,08
Werte		0,317	0,163	0,082
Verdünnungsfaktor	erwartet	-	2	4
	beobachtet	-	1,940	3,858

C)



D)

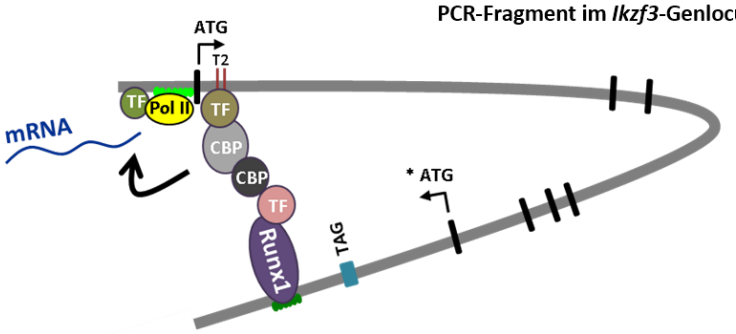


Abb. 20: Die Bindung von Runx1 unterstützt Konformationsänderungen in der DNA, die die Transkription spezifischer Gene aktiv beeinflussen können.
A) Aufgeführt sind die während der 3C-Analyse erhaltenen Restriktionseffizienzen der einzelnen HindIII-Fragmente des *Ikzf3*-Genlocus. Für die Spaltung der DNA wurde der 3C-Ansatz über Nacht bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym HindIII inkubiert und anschließend geschnittene sowie nicht-geschnittene DNA-Proben mithilfe von qRT-PCR-Analysen miteinander verglichen. **B)** Bestimmung der Probenreinheit mittels qRT-PCR-Analyse. Verschiedene Verdünnungen der 3C-Probe (A) wurden mithilfe von qRT-PCR analysiert und der erwartete Verdünngsfaktor mit dem beobachteten Faktor verglichen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel: $10^{(Ct-b)/a}$. **C)** Dargestellt ist die relative Vernetzungsfrequenz der einzelnen HindIII-Fragmente des *Ikzf3*-Genlocus mit der Runx1-Bindungsstelle im potentiellen *Enhancer*-Bereich 90 kb stromabwärts der Promotorregion. Für diese Analyse wurden die Ligationsprodukte des 3C-Ansatzes mithilfe von qRT-PCR-Analysen quantifiziert und auf die Expression von Gapdh (hellblaue Linie) oder auf Kontroll-Interaktionsfrequenzen im *Ercc3*-Locus (dunkelblaue Linie) normalisiert. **D)** Modell einer möglichen Interaktion des Runx1-besetzten *Enhancer*-Elements (dunkelgrün) mit der Promotorregion des *Ikzf3*-Locus (hellgrün). Die Bindung von Runx1 bewirkt die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren zu*m Enhancer*-Bereich. Dies wiederum begünstigt die Interaktion mit weiteren Ko-Faktoren, die ein *Looping* der DNA zum Fragment T2 bewirken und so die Wechselwirkung mit dem Promotor ermöglichen, um die verstärkte Transkription von *Ikzf3* zu aktivieren.

5.3 Die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B werden stromabwärts des Prä-BZRs verstärkt exprimiert

Durch die Analyse des B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodells konnte in den zuvor durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität von Runx1 vor allem für die weitere Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen nach Stimulation des Prä-BZRs essentiell zu sein scheint. Darüber hinaus konnten die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B als direkte Runx1-Zielgene identifiziert und für diese Gene erhöhte Expressionslevel in Prä-B-Zellen festgestellt werden. Um zu bestätigen, dass die Runx1-abhängige Expression von *Ikzf3* und *Spib* gezielt nach Aktivierung des Prä-BZRs erhöht wird, sollten mithilfe von zwei verschiedenen Zellkultursystemen, in denen eine gezielte Stimulation des Prä-BZRs möglich ist, die Transriptlevel beider Runx1-Zielgene analysiert werden.

5.3.1 Bestätigung der differenziellen Expression in einem induzierbaren Prä-B-Zellsystem

Für das erste Zellkultursystem wurde eine IL-7-abhängige Prä-B-Zelllinie verwendet, die aus *Blnk*$^{-/-}$ Mäusen isoliert wurde. Diese Zellen exprimieren den Prä-BZR, können jedoch aufgrund der fehlenden Expression von *Blnk* nicht in späte Prä-B-Zellen ausdifferenzieren (Su et al., 2003). Um eine gezielte Aktivierung des Blnk-abhängigen Signalwegs stromabwärts des Prä-BZRs zu erreichen, wurden diese als Oct-Zelllinie bezeichneten Zellen zunächst mit einem γ-retroviralen Vektor, der für ein BLNK-ERt2-Fusionsprotein kodiert, transduziert und die transduzierten Zellen mittels FACS-Analyse sortiert. Diese Zellen werden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit als Oct#856-Zellen bezeichnet. Vergleichbar mit der Expression des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins ist auch das hier verwendete Konstrukt zunächst von Chaperonen umgeben und kann nicht zum Prä-BZR-Komplex rekrutiert werden. Erst nach Zugabe von 1 µM 4-OHT liegt das Fusionsprotein frei im Zytoplasma vor, die Rekrutierung zum Prä-BZR und die Aktivierung der stromabwärts gelegenen Signalkaskaden können erfolgen (Abb. 21A). Die Aktivierung des Prä-BZRs wird zudem durch die Zugabe eines Antikörpers (α µHC) gegen die schwere Kette des Prä-BZRs verstärkt. In einer ersten Analyse sollte die gezielte Aktivierung des BLNK-ERt2-Fusionsproteins in diesem Zellsystem bestätigt werden. Die Zellen wurden dazu in unterschiedlichen Ansätzen mit oder ohne 4-OHT bzw. α µHC für 10 min inkubiert, Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot-Analyse die Phosphorylierung von BLNK-ERt2 untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass erst nach Stimulation der Zellen mit 4-OHT die Phosphorylierung des BLNK-Fusionsproteins möglich war, wobei das Signal nach Zugabe des µHC-spezifischen Antikörpers noch verstärkt wurde (Abb. 21B). Für alle weiteren Experimente wurden somit zur vollständigen Aktivierung des BLNK-abhängigen Prä-BZR-Signalwegs sowohl 4-OHT als auch der Antikörper zu den Zellen gegeben.

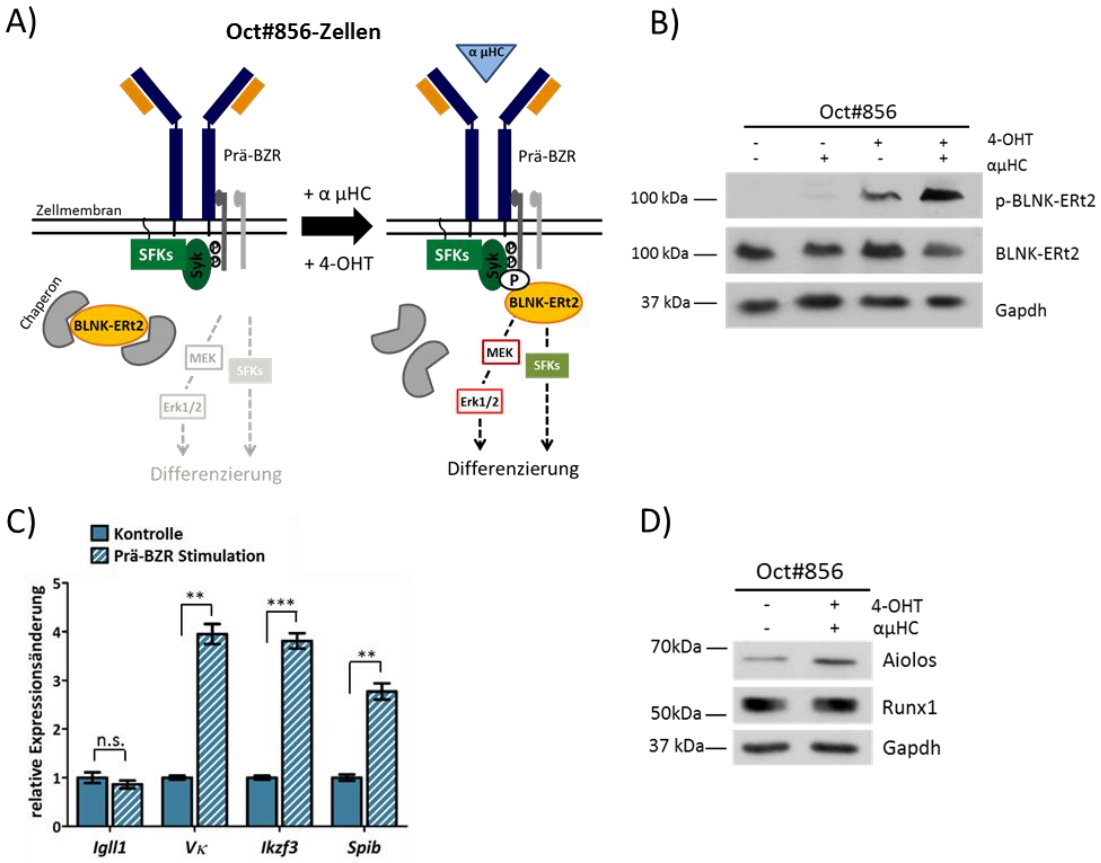


Abb. 21: Die Aktivierung des BLNK-abhängigen Prä-B-Zellrezeptorsignalwegs verstärkt die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib*.
A) Schematische Darstellung der Prä-BZR-Aktivierung in Oct#856-Zellen. Durch Überexpression eines BLNK-ERt2-Fusionsproteins können in dieser Prä-B-Zelllinie durch Zugabe von 1 µM 4-OHT und 10 µg/mL µHC-spezifischen Antikörper die BLNK-abhängigen Prä-BZR-Signalwege induziert werden. **B)** Westernblot-Analyse der Oct#856-Zellen nach Stimulation. Die Zellen wurden 10 min mit 4-OHT sowie dem µHC-Antikörper inkubiert und die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phosphorylierung von BLNK-ERt2 (100 kDa) ist erst nach Stimulation der Zellen zu detektieren. Zum Vergleich der Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen Gapdh (37 kDa) verwendet. **C)** Gezeigt werden die relativen Expressionslevel verschiedener Gene nach Stimulation der Oct#856-Zellen. Für diese Analyse wurden die Zellen für 48 Stunden stimuliert und ohne IL-7 kultiviert. Die mRNA-Level vor und nach Prä-BZR-Stimulation wurden anschließend mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Für die Normalisierung der cDNA-Proben wurde die Expression von *Hrpt* verwendet. **D)** Westernblot-Analyse der Oct#856-Zellen nach 24 stündiger Stimulation. Die Expression von Aiolos (58 kDa) ist nach Aktivierung des Prä-BZRs erhöht, während die Runx1-Expression (50 kDa) unverändert bleibt. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde Gapdh (37 kDa) verwendet.

Zur Analyse der relativen Expressionslevel ausgewählter Gene wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden stimuliert und zusätzlich die Anreicherung von differenzierten Zellen durch Entzug von IL-7 begünstigt. Nach erfolgreicher RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA erfolgte anschließend die Bestimmung der relativen Genexpression mithilfe von qRT-PCR-Analysen (Abb. 21C). Die weitere Differenzierung der Zellen konnte durch die verstärkte Expression von *Vκ*, einer Komponente der leichten Kette des BZRs, bestätigt werden. Die Reduktion der Expression von *Igll1*, einer Komponente der Ersatz-leichten-Kette (SLC), die normalerweise während der weiteren Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen stattfindet, konnte jedoch nicht detektiert werden. Die Transkriptlevel der beiden Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg nach Stimulation der Zellen und somit stromabwärts der BLNK-abhängigen Signaltransduktion. Auf Proteinebene konnte nach

24-stündiger Stimulation der Zellen für Aiolos ebenfalls eine verstärkte Expression gezeigt werden. Die Expression des Runx1-Proteins hingegen blieb, wie erwartet, konstant (Abb. 21D). Für die Detektion von Spi-B wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Spi-B-spezifischer Antikörper getestet. Es war jedoch nicht möglich einen zuverlässigen Antikörper zu identifizieren, sodass die Expression dieses Transkriptionsfaktors auf Proteinebene nicht analysiert werden konnte.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mithilfe des Oct#856-Zellsystems eine gezielte Aktivierung des BLNK-abhängigen Prä-BZR-Signalwegs möglich war und die weitere Differenzierung der Zellen induziert werden konnte. Hierdurch konnte die spezifische Hochregulation der Transkriptionsfaktoren *Ikzf3* und *Spib* stromabwärts der BLNK-abhängigen Prä-BZR-Signaltransduktion bestätigt werden.

5.3.2 Bestätigung der differentiellen Expression der Runx1-Zielgene in einem induzierbaren Pro-B-Zellsystem

5.3.2.1 Etablierung einer induzierbaren Pro-B-Zelllinie aus *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen

Um in einem weiteren Zellsystem die Hochregulation der Runx1-Zielgene stromabwärts des Prä-BZRs zu bestätigen, sollte eine Pro-B-Zelllinie, in der gezielt die Differenzierung zu Prä-B-Zellen induziert werden kann, etabliert werden. Als Donor für diese Zelllinie dienten *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse. Durch die fehlende Expression des Rag1-Proteins kann in diesen Mäusen keine Rekombination der Immunglobulin-Loci detektiert werden und ein Differenzierungsblock findet bereits in den frühen B-Zellvorläufern statt (Mombaerts et al., 1992). Für die Etablierung der Zelllinie wurde das Knochenmark aus den *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen entnommen und mittels FACS-Sortierung die für den B-Zellmarker CD19 positiven Vorläuferzellen isoliert. Diese Zellen wurden anschließend mit γ-retroviralen Vektoren, die für das Onkogen BCR-ABL sowie für den anti-apoptotischen Faktor BCL-X kodieren, transduziert, wobei in diesem Experiment die Transduktion über Retronektin-beschichtete Zellkulturplatten erfolgte (Abb. 22A). Zur Selektion der Zellen kodierten beide verwendeten γ-retroviralen Vektoren ebenfalls für den Fluoreszenzmarker Venus. Nach etwa sieben Tagen war ein deutliches Wachstum der Zellen zu erkennen, sodass nach zehn Tagen ein Teil der Zellen für eine FACS-Analyse zur Charakterisierung der erhaltenen Zelllinie verwendet werden konnte. Wie erwartet, waren nahezu alle analysierten Zellen positiv für den Fluoreszenzmarker Venus. Ob die Zellen BCR-ABL und BCL-X oder jeweils nur einen Faktor exprimierten, konnte jedoch nicht unterschieden werden. Weiterhin war die Expression der B-Zellmarker CD19 sowie B220 zu detektieren, jedoch keine Expression von Oberflächenantigenen, die charakteristisch für Zellen der myeloiden Linie sind (Abb. 22B). Die genauere Analyse dieser B-Zellen zeigte zudem, dass weder IgM als Marker für unreife B-Zellen, noch CD25 als Marker für späte Prä-B-Zellen exprimiert wurden. CD43 als Oberflächenantigen früher B-Zellen konnte hingegen auf der Zellmembran aller Zellen identifiziert werden (Abb. 22C).

Somit konnte die erfolgreiche Etablierung einer Pro-B-Zelllinie aus primären Zellen der *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse nachgewiesen werden.

Zur Induktion der Differenzierung in Prä-B-Zellen erfolgte die Transduktion der *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen mit einem γ-retroviralen Vektor, der für eine bereits funktional rekombinierte schwere Kette des BZRs kodierte (µHC). Hierdurch sollte die Expression und die nachfolgende Signalgebung des Prä-BZRs ermöglicht werden. Als Negativ-Kontrolle dienten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen, die mit einem γ-retroviralen Vektor, der lediglich für das Markerprotein GFP kodierte, transduziert wurden. Je nach experimentellem Aufbau wurde der Anteil an transduzierten Zellen nach 48, 72 oder 96 Stunden mittels FACS-Analyse sortiert und RNA- bzw. Protein aus den Zellen isoliert (Abb. 22D).

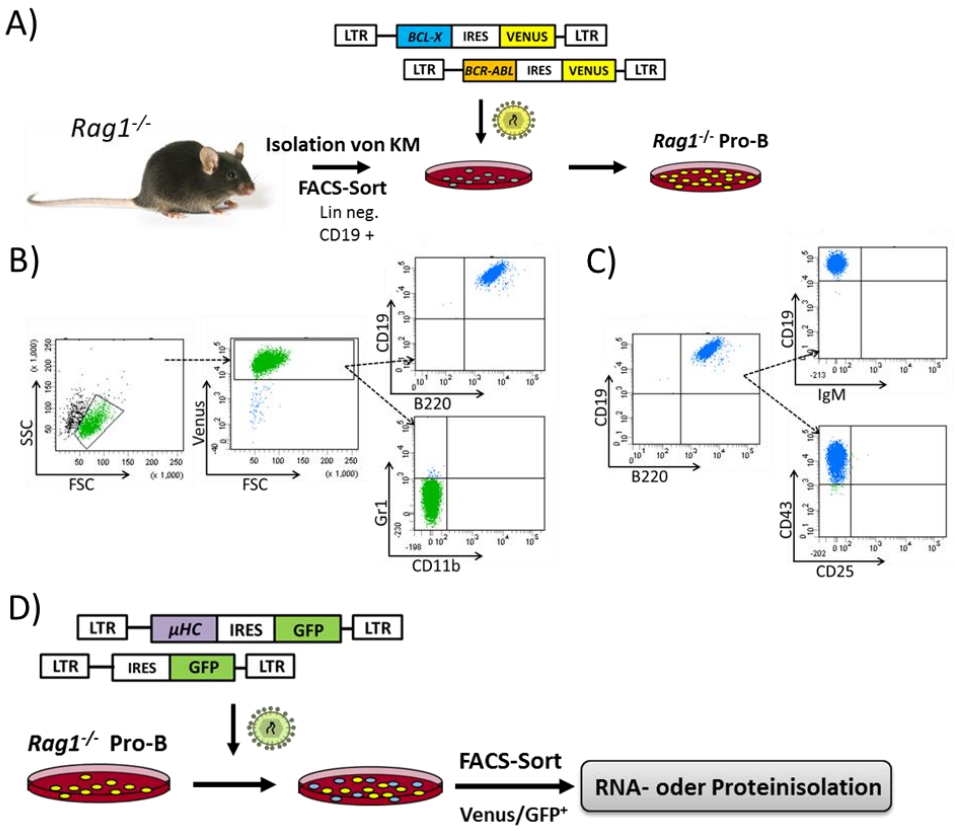


Abb. 22: Etablierung einer induzierbaren Pro-B-Zelllinie aus *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen.
A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Das Knochenmark aus *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen wurde isoliert und mittels FACS-Sortierung die Pro-B-Zellpopulation isoliert. Diese Zellen wurden anschließend mithilfe γ-retroviraler Vektoren mit BCL-X/Venus und BCR-ABL/Venus transduziert. **B)** Durchflusszytometrische Analyse der transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Zellen. 10 Tage nach der Transduktion exprimierten alle Zellen die B-Zellmarker CD19 und B220, während die myeloiden Oberflächenantigene Gr1 und CD11b nicht detektiert werden konnten. **C)** FACS-Analyse der CD19^{+}/B220^{+} *Rag1*$^{-/-}$ Zellen. Die Zellen exprimierten weder CD25 noch IgM, wohingegen CD43 Expression deutlich zu detektieren war. **D)** Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Zellen der zuvor etablierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zelllinie wurden mittels γ-retroviraler Vektoren, die für eine bereits rekombinierte schwere Ig-Kette (µHC) bzw. nur für GFP kodierten, transduziert. Der Anteil an transduzierten Zellen nach 48, 72 oder 96 Stunden per FACS-Analyse sortiert und je nach Fragestellung RNA oder Protein isoliert.

5.3.2.2 Analyse der Genexpression in transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen auf mRNA- und Proteinebene

Die Funktionalität des hier entwickelten Zellsystems wurde zum einen anhand der Expressionslevel spezifischer Gene überprüft, die bei der Differenzierung von Pro-B- in Prä-B-Zellen charakteristische Änderungen zeigen. Dazu wurde die Signaltransduktion des Prä-BZRs wie unter 5.3.2.1 beschrieben aktiviert und die Zellen nach 48, 72 oder 96 Stunden lysiert, um RNA oder Protein zu isolieren. Die erhaltene RNA wurde anschießend in cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel verschiedener Gene mithilfe von qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zum anderen wurden die aus den Zellen extrahierten Proteine mittels Westernblot-Analyse untersucht. Es konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass die Expression von *Igll1* signifikant herunter reguliert wurde. Dies ist ein Merkmal der frühen B-Zelldifferenzierung, findet nach der Signaltransduktion des Prä-BZRs statt und ist für die weitere Differenzierung in späte Prä-B-Zellen erforderlich. Gleichzeitig konnte in diesen Zellen, wie erwartet, keine IgL-Expression detektiert werden, da aufgrund der fehlenden Aktivität der Rag-Proteine die Rekombination der Immunglobulin-Loci nicht stattfinden kann (Abb. 23A). Eine weitere Differenzierung in unreife B-Zellen mit Expression der leichten Kettes des BZRs kann somit in diesem Zellsystem nicht erfolgen. Die Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs konnte zudem auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 23B). Sowohl die Phosphorylierung von Blnk als auch die Phosphorylierung der MAPK p-38, die stromabwärts des Prä-BZRs stattfinden, konnten nachgewiesen werden. Somit konnte dieses induzierbare Zellsystem für die Expressionsanalyse der beiden Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B genutzt werden. Dabei konnte für beide Faktoren eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene nach Aktivierung der Prä-BZR-Signalgebung festgestellt werden. Die verstärkte Expression von *Ikzf3* konnte 72 Stunden nach Aktivierung des Prä-BZRs detektiert werden, wobei eine 3,3-fache Erhöhung des *Ikzf3*-Transkriptlevel vorlag (Abb. 23A). Nach 96 Stunden nahm die verstärkte Expression jedoch wieder ab. Für die relative mRNA-Expression von *Spib* konnte 96 Stunden nach Prä-BZR-Aktivierung eine deutliche Steigerung gezeigt werden. Diese war im Vergleich zu den nicht differenzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen 9,5-fach erhöht (Abb. 23A). Auf Proteinebene konnte die erhöhte Expression von Aiolos jedoch für keinen der untersuchten Zeitpunkte bestätigt werden (Abb. 23B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass aus der Pro-B-Zellpopulation aus dem Knochenmark von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen durch Transduktion mit dem Onkogen *BCR-ABL1* sowie durch Überexpression des anti-apoptotischen Faktors BCL-X eine Pro-B-Zelllinie etabliert werden konnte. Durch Überexpression der schweren Kette des BZRs konnte zudem gezielt die Differenzierung der Zellen induziert und so auf mRNA-Ebene die verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung erneut bestätigt werden.

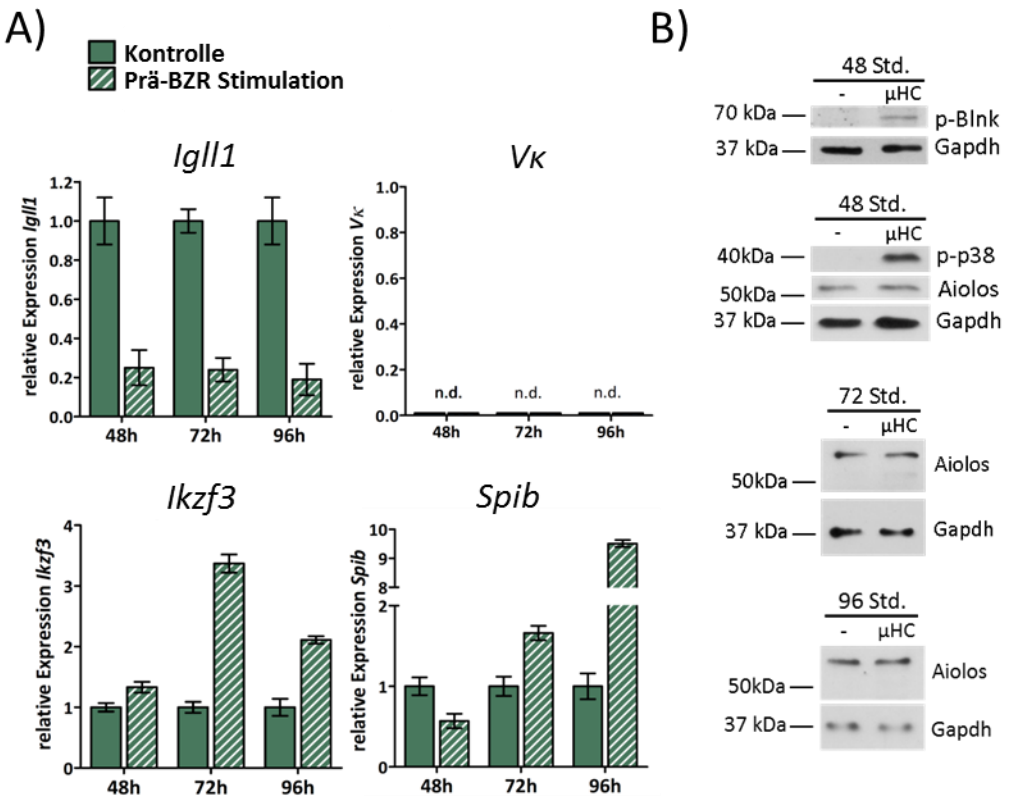


Abb. 23: Die Aktivierung des Prä-B-Zellrezeptors in transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen führt zur verstärkten Expression von *Ikzf3* und *Spib* auf mRNA-Ebene.
A) qRT-PCR-Analysen der *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen nach Überexpression der schweren Kette des Prä-BZRs. Die transduzierten Zellen wurden entsprechend der angegebenen Zeitpunkte kultiviert, bevor die Sortierung der Zellen und die RNA-Isolierung erfolgten. *Hprt* diente als Referenzgen. n.d.: nicht detektierbar. **B)** Westernblot-Analyse transduzierter *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen. 48, 72 und 96 Stunden nach Transduktion erfolgte die ProteinIsolierung und die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Die Aktivierung des Prä-BZRs in den µHC überexprimierenden Zellen konnte durch Phosphorylierung von BLNK (68 kDa) und der MAPK p38 (38 kDa) nachgewiesen werden. Aiolos (58 kDa) hingegen zeigte keine verstärkte Expression. Die Expression von Gapdh (37 kDa) diente als Ladungskontrolle.

5.4 Wie wird die Aktivität von Runx1 in den frühen B-Zellvorläufern reguliert?

In den vorangegangen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass Runx1 die Expression einer Reihe von direkten Zielgenen in den frühen B-Zellvorläufern beeinflusst, selbst jedoch auf einem konstanten Level exprimiert wird. So konnte für die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B eine spezifische Expressionsänderung nach der Aktivierung des Prä-BZRs in den frühen Prä-B-Zellen detektiert werden. Die transkriptionelle Aktivität von Runx1 scheint demnach am Prä-BZR-Kontrollpunkt gezielt verstärkt zu sein, wobei dies nicht durch ein erhöhtes Expressionslevel von Runx1 begründet werden kann. Wie sind also die spezifischen Bindungen von Runx1 an seine Zielgene stromabwärts der Prä-BZR-Signaltransduktion zu erklären? Zur Beantwortung dieser Frage sollte im letzten Teil der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die posttranslationale Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste stromabwärts des Prä-BZRs die transkriptionelle Aktivität von Runx1 in den hier betrachteten B-Zellvorläufern beeinflusst. Die Phosphorylierung eines Proteins dabei kann sowohl an Tyrosin- als auch an Serin- bzw. Threoninresten stattfinden und wird

von zwei verschiedenen Enzymklassen, den Tyrosin- bzw. den Serin/Threonin-Proteinkinasen, katalysiert (Berg et al., 2007). Daher sollten in den folgenden Experimenten beide Möglichkeiten der Phosphorylierung betrachtet werden.

5.4.1 Runx1 wird stromabwärts des Prä-BZRs phosphoryliert

Für die Untersuchung der Runx1-Phosphorylierung wurden die induzierbaren Oct-Zellen verwendet, die mit dem BLNK-ERt2-Fusionsprotein transduziert waren (Oct#856-Zellen). Mithilfe dieses Zellsystems sollten mögliche Unterschiede der Runx1-Phosphorylierungslevel vor und nach der BLNK-abhängigen Signalgebung durch den Prä-BZR analysiert werden. Zur Untersuchung der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste im Runx1-Protein wurden die Oct#856-Zellen 10 Minuten mit 4-OHT und dem µHC-spezifischen Antikörper bzw. mit den entsprechenden Kontrollen stimuliert, bevor anschließend Proteinlysate hergestellt wurden. Ein kleiner Teil der Lysate wurde als Input-Kontrollen zurückbehalten, während mit den restlichen Lysaten eine IP durchgeführt wurde. Hierzu wurde zu den Lysaten ein Runx1-spezifischer Antikörper oder $IgG_{Kaninchen}$ als Kontrolle sowie jeweils Agarose *beads* zugegeben. Die aufgereinigten Ansätze wurden anschließend mittels Westernblot-Analyse untersucht und die Tyrosinphosphorylierung im Runx1-Protein detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass bereits vor Aktivierung des Prä-BZRs eine basale Phosphorylierung der Tyrosinreste vorliegt, diese jedoch nach Stimulation des Prä-BZRs weiter zunimmt (Abb. 24A).

Um die Phosphorylierung, die von Serin/Threonin-Proteinkinasen katalysiert wird zu untersuchen, konnte ein Runx1-Antikörper verwendet werden, der spezifisch die Phosphorylierung des Serinrestes 249 im Runx1-Protein erkennt. Für diesen Aminosäurerest ist bereits beschrieben, dass die Phosphorylierung in anderen Linien des hämatopoetischen Systems die Aktivität von Runx1 beeinflusst (Wee et al., 2008; Huang et al., 2012). Für die Detektion dieser Phosphorylierung musste folglich keine IP durchgeführt werden, die Oct#856-Zellen wurden lediglich wie bereits oben angegeben für 10 Minuten stimuliert und Proteinlysate hergestellt. Durch die Verwendung des spezifischen Antikörpers konnten mittels Westernblot-Analyse die Phosphorylierungslevel des Serinrestes 249 im Runx1-Protein vor und nach der Signaltransduktion durch den Prä-BZR detektiert werden. Auch hier war eine basale Phosphorylierung bereits vor der Aktivierung des Prä-BZRs zu erkennen, die wiederum durch eine deutliche Zunahme stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung charakterisiert war (Abb. 24B). Die Phosphorylierungslevel des Serinrestes 249 sollten zudem im induzierbaren *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellsystem analysiert werden. Dazu wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit einem γ-retroviralen Vektor, der für eine funktional rekombinierte schwere Immunglobulinkette kodiert bzw. einem γ-retroviralen GFP-Kontrollvektor transduziert und diese Ansätze für 48 oder 72 Stunden inkubiert. Der Anteil an transduzierten Zellen wurde anschließend mittels einer FACS-Sortierung isoliert und Proteinlysate hergestellt. In diesem Zellsystem konnte jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine deutliche Änderung der

Runx1-Phosphorylierungslevel gezeigt werden (Abb. 24C). Hier konnte aufgrund des Systems jedoch erst 48 Stunden nach Induktion der Prä-BZR-Signalgebung die Phosphorylierung untersucht werden. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Transkriptionsfaktors sind jedoch sehr dynamische Prozesse. Dabei ist die Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste oft eine der ersten PTMs, die die Aktivität eines Transkriptionsfaktors beeinflusst und kann unter anderem Wechselwirkungen mit spezifischen Ko-Aktivatoren fördern. Die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors ist so weiter stabilisiert, während die initiierende Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste nicht mehr detektierbar ist (Whitmarsh & Davis, 2000). Somit war das BLNK-ERt2-abhängige Prä-B-Zellsystem aufgrund der flexibleren Stimulationszeiten zur Analyse der Phosphorylierung von Runx1 stromabwärts des Prä-BZRs besser geeignet und die hierdurch erhaltenen Ergebnisse wurden als Grundlage für die weiteren Versuche verwendet.

Zusammengefasst konnte sowohl in Bezug auf die Tyrosinphosphorylierung als auch in Bezug auf die Serinphosphorylierung von Runx1 festgestellt werden, dass bereits vor der Prä-BZR-Aktivierung in Oct#856-Zellen eine basale Phosphorylierung von Runx1 vorlag. Diese nahm jedoch nach Stimulation der Signalwege stromabwärts des Prä-BZRs deutlich zu.

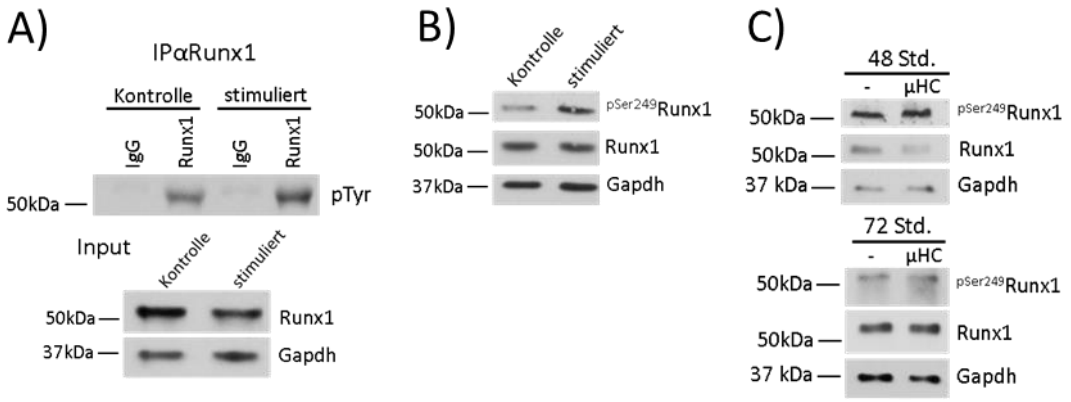


Abb. 24: Runx1 wird stromabwärts der Prä-B-Zellrezeptorsignaltransduktion verstärkt phosphoryliert.
Für die in A) und B) dargestellten Analysen wurden Oct#856-Zellen 10 min mit 4-OHT und dem µHC-spezifischen Antikörper stimuliert. Anschließend erfolgte die Isolierung von Gesamtprotein. **A)** Analyse der Tyrosinphosphorylierung im Runx1-Protein mittels Westernblot. Für diesen Versuch wurde Runx1-Protein mithilfe einer Immunpräzipitation angereichert und die Ansätze anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Stimulation des Prä-BZR konnte eine stärkere Runx1-Phosphorylierung (pTyr-Runx1, ~52 kDa) detektiert werden. Im Input konnten Runx1 (52 kDa) sowie Gapdh (37 kDa) als Kontrollen detektiert werden. **B)** Analyse der Phosphorylierung von S249 im Runx1-Protein. Die Lysate wurden direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Aktivierung des Prä-BZRs konnten erhöhte Phosphorylierungslevel des S249 detektiert werden. Runx1 und Gapdh dienten als Ladungskontrollen. **C)** Westernbot-Analyse der Serinphosphorylierung in transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen. Die Zellen wurden 48 bzw. 72 Stunden nach Transduktion durchflusszytometrisch sortiert und Gesamtprotein isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Nach Induktion des Prä-BZRs konnte kein erhöhtes Phosphorylierungslevel von Runx1 detektiert werden. Die Expression von Gapdh und Runx1 dienten als Ladungskontrollen.

5.4.2 Die Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein ist notwendig für die Expression bestimmter Zielgene

Nachdem durch die zuvor durchgeführten Experimente gezeigt werden konnte, dass sowohl Tyrosinreste als auch der Serinrest 249 im Runx1-Protein stromabwärts des Prä-BZRs phosphoryliert werden, sollte nun untersucht werden, ob die verstärkte Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität von Runx1 beeinflusst. Dazu wurden zum einen unterschiedliche Phosphorylierungs-Mutanten von Runx1 hergestellt und zum anderen spezifische Kinase-Inhibitoren eingesetzt, um schließlich auf mRNA-Ebene die Auswirkungen der verringerten Runx1-Phosphorylierung auf die Expression der Zielgene *Ikzf3* und *Spib* zu analysieren.

5.4.2.1 Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten

Es wurde bereits eine Reihe von Aminosäureresten in verschiedenen Domänen des Runx1-Proteins beschrieben, die einen Einfluss auf dessen Aktivität zeigen (Wee et al., 2008; Huang et al., 2012). Zur Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten wurden daher jeweils mehrere Aminosäurereste in unterschiedlichen Proteindomänen mithilfe von zielgerichteter Mutagenese verändert (Abb. 25A). Die DNA des bereits zuvor verwendeten γ-retroviralen Vektors, der für das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein kodierte, diente hierbei als Ausgangssequenz, um auch für die Analyse der Phosphorylierungsmutanten ein induzierbares Zellsystem nutzen zu können. Die Mutanten A und B wiesen Mutationen spezifischer Aminosäurereste in der Aktivierungsdomäne von RUNX1 auf. Bei der Mutante A waren die Serine S249, S266 und S276 sowie das Threonin T273 mutiert, wobei die genannten Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden. So sollte aufgrund der ähnlichen Struktur von Serin bzw. Threonin und Alanin die korrekte Faltung des Proteins gewährleistet werden, die Phosphorylierung dieser Reste konnte jedoch nicht mehr stattfinden. Die Mutante B wies Mutationen der Tyrosinreste Y254, Y258 und Y260 auf. Diese Aminosäuren wurden durch die strukturell sehr ähnlich aufgebaute Aminosäure Phenylalanin (abgekürzt durch F) substituiert, damit ebenfalls keine Phosphorylierung dieser Reste mehr möglich war. Die Mutante C hingegen war durch Mutationen spezifischer Tyrosinreste in der Inhibierungsdomäne, die stromabwärts der Aktivierungsdomäne lokalisiert ist, gekennzeichnet. Die Reste Y375, Y378, Y379 sowie Y386 wurden ebenfalls durch Phenylalanin ersetzt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine konstitutive Phosphorylierung der Tyrosinreste in den zuvor genannten Proteindomänen eine Auswirkung auf die Expression der Zielgene zeigt. Hierzu wurden die Tyrosinreste in der Aktivierungs- sowie Inhibierungsdomäne zusätzlich zu Asparaginsäure (abgekürzt durch D) mutiert, um die konstitutive Phosphorylierung dieser Aminosäurereste im Runx1-Protein nachzuahmen (Mutanten 2B und 2C). Die erfolgreichen Mutationen wurden durch die Sequenzierung der erhaltenen Vektor-Konstrukte bestätigt.

Im Anschluss an die Klonierung der Mutanten wurden Zellen der Pro-B-Zelllinie BMiFLT3 mit den γ-retroviralen Vektoren, die für die unterschiedlichen RUNX1-ERt2-Mutanten kodierten, transduziert und der Anteil an transduzierten Zellen mithilfe einer FACS-Analyse sortiert. In den so erhaltenen Zelllinien sollte zunächst die Expression der RUNX1-ERt2-Fusionsproteine für die Mutanten A, B und C bestätigt werden. Dazu wurden die Zellen der unterschiedlichen Zelllinien für 24 Stunden mit 4-OHT oder mit der entsprechenden Kontrolle inkubiert und anschließend die Proteine in Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert. Für alle RUNX1-ERt2-Mutanten konnte so zum einen die Expression der Fusionsproteine sowie deren Translokation in den Zellkern nach 4-OHT-Zugabe nachgewiesen werden (Abb. 25B). Im Fall der Mutante A war jedoch im Vergleich zu den anderen Mutanten bereits vor Stimulation mit 4-OHT eine Expression des mutierten Fusionsproteins im Zellkern zu detektieren. Nach 4-OHT-Zugabe war dieses Signal aber deutlich stärker, sodass auch für die Mutante A in diesem Zellsystem eine Translokation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in den Zellkern gezielt induziert werden konnte.

Für die Mutante A konnte darüber hinaus in einem weiteren Experiment die erfolgreiche Mutation auf Proteinebene durch Verwendung des spezifischen ^{pSer249}Runx1-Antikörpers überprüft werden. Hierzu wurden BMiFLT3-Zellen, die die Mutante A exprimierten sowie Kontrollzellen, die das unveränderte RUNX1-ERt2-Fusionsprotein bzw. die Mutante B exprimierten, für 24 Stunden mit oder ohne 4-OHT inkubiert. Anschließend wurden aus diesen Ansätzen Gesamtzellextrakte hergestellt und die Proteinexpression mittels einer Westernblot-Analyse detektiert. Erwartungsgemäß zeigten nach Zugabe von 4-OHT die Lysate, die das unveränderte RUNX1-ERt2-Fusionsprotein und die Mutante B exprimierten und damit keine Mutation des Serinrestes 249 aufwiesen, eine deutliches Phosphorylierungssignal. In den Lysaten der Zellen, die die Mutante A exprimierten konnte hingegen auch nach 4-OHT-Behandlung keine Phosphorylierung von S249 nachgewiesen werden und so die erfolgreiche Mutation bestätigt werden (Abb. 25C).

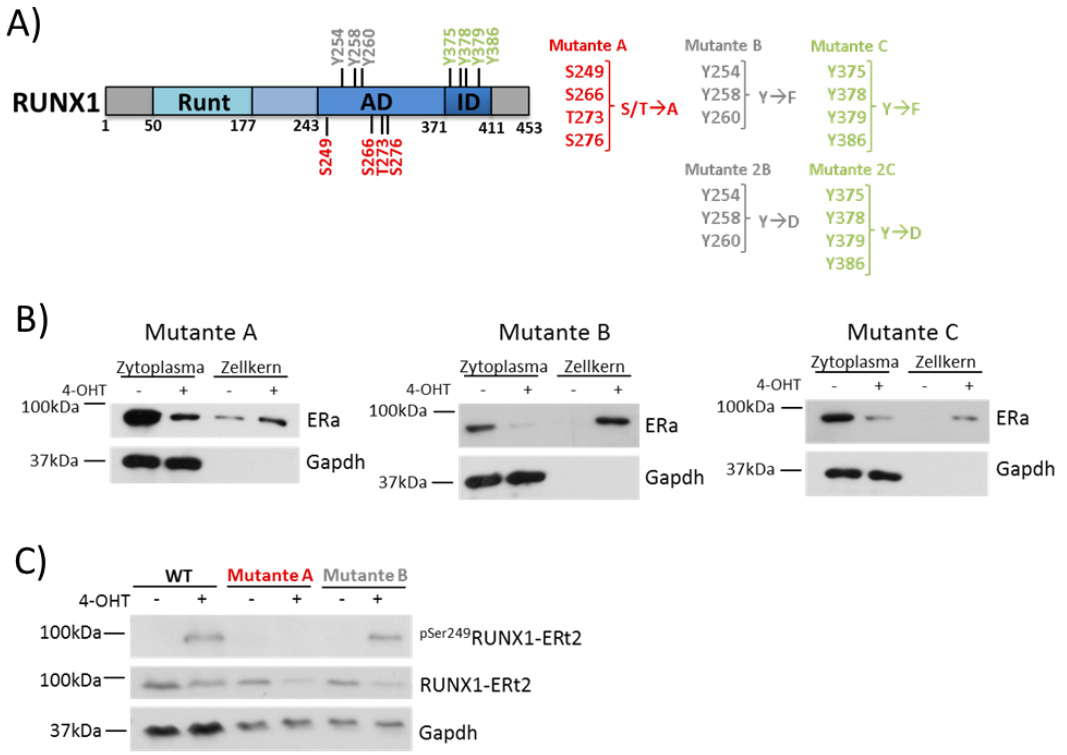


Abb. 25: Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten.
A) Übersicht über die verschiedenen Phosphorylierungsmutanten von RUNX1. Mutante A umfasste Mutationen von Serin- bzw- Threoninresten in der Aktivierungsdomäne, während in den Mutanten B, 2B, C und 2C spezifsche Tyrosinreste mutiert waren, die entweder in der Aktivierungsdomäne (B, 2B) oder in der stromabwärts gelegenen Inhibierungsdomäne (C, 2C) lokalisiert sind. **B)** Westernblot-Analyse der Translokation der RUNX1-ERt2-Phosphorylierungsmutanten in den Zellkern. BMiFLT3-Zelllinien, die die verschiedenen Mutanten exprimierten wurden für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT kultiviert und die Proteine in Kern- sowie Zytoplasmafraktion isoliert. Die Auftrennung erfolgte mithilfe von SDS-PAGE. Für alle RUNX1-ERt2-Mutanten (82 kDa) konnte eine verstärkte Expression des Fusionsproteins im Zellkern erst nach 4-OHT Zugabe gezeigt werden. Die Expression von Gapdh diente als Kontrolle für die erfolgreiche Fraktionierung der Proteinlysate. **C)** Westernblot-Analyse der Serinphosphorylierungslevel der Mutante A. BMiFLT3-Zellen, die das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein (WT) bzw. die Mutante A und B exprimierten wurden für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT behandelt, anschließend Gesamtprotein isoliert und dies mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es konnte keine Phosphorylierung der Mutante A detektiert werden, während die beiden Kontrollen (WT und Mutante B) ein deutliches Signal zeigten. Runx1 (52 kDa) und Gapdh (37kDa) wurden als Ladungskontrollen verwendet.

5.4.2.2 Die Überexpression der RUNX1-Phosphorylierungsmutanten beeinflusst die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib*

In weitergehenden Analysen sollte die transkriptionelle Aktivität der RUNX1-Phosphorylierungsmutanten untersucht werden. Dazu sollte das induzierbare RUNX1-ERt2-Überexpressionssystem verwendet werden (siehe 5.1.3.1). Bei Aktivierung des unveränderten RUNX1-ERt2-Fusionsproteins in den BMiFLT3-Zellen konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Zielgene *Ikzf3* und *Spib* verstärkt exprimiert werden (Kriebitzsch, Masterarbeit 2011). Gleichzeitig konnte aber auch festgestellt werden, dass die Aktivierung dieses Fusionsproteins das Überleben bzw. die Proliferation der transduzierten BMiFLT3-Zellen negativ zu beeinflussen scheint. Wechselwirkungen zwischen der Signaltransduktion durch den in diesem Zellsystem konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptor und weiteren erst nach Überexpression von RUNX1-ERt2 aktivierten

Signalwegen, die von der Regulation spezifischer Runx1-Zielgene abhängig sind, könnten hierbei das Überleben bzw. die Proliferation der Zellen beschränken (Kriebitzsch, Masterarbeit 2011). Auf Grundlage dieser Beobachtungen sollten mithilfe eines Kompetitionsexperiments im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise auf Unterschiede in der Aktivierung der Runx1-Zielgene zwischen den Phosphorylierungsmutanten A, B und C sowie dem unveränderten RUNX1-ERt2-Fusionsprotein (WT) erhalten werden. Dazu wurden für alle Ansätze Zellsuspensionen aus den transduzierten, Venus/GFP-positiven Zellen und den nicht-transduzierten, nur GFP-positiven BMiFLT3-Zellen hergestellt. Anschließend wurden die Ansätze jeweils mit 4-OHT oder der entsprechenden Kontrolle kultiviert, um die Auswirkung der Aktivierung der jeweiligen Fusionsproteine auf die Proliferation bzw. das Überleben der transduzierten Zellen zu untersuchen. Dazu wurde der Anteil an transduzierten Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten BMiFLT3-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen durchflusszytometrisch verfolgt, alle 24 Stunden Aliquots aus der Zellkultur der verschiedenen Ansätze entnommen und der Anteil an Venus/GFP-positiven Zellen mithilfe einer FACS-Analyse bestimmt. Zu Beginn der Analyse betrug der Anteil Venus/GFP-positiven Zellen in allen Ansätzen 50% (Abb. 26A). Bereits nach 48 Stunden war jedoch in allen 4-OHT-behandelten Ansätzen eine deutliche Abnahme des Anteils an transduzierten Zellen zu beobachten. Für die Zellsuspension, die das unveränderte RUNX1-ERt2-Fusionsprotein exprimierte, konnte ein Anteil an transduzierten Zellen von 8% gemessen werden, für die Mutante B lag dieser nahezu vergleichbar bei 6%. Die Anteile an transduzierten Zellen in den Ansätzen, die die Mutanten A bzw. C exprimierten, lagen bei 13% bzw. 27% und waren damit zweifach bzw. 3,4-fach höher im Vergleich zu den Zellen, die das unveränderte RUNX1-ERt2-Fusionsprotein exprimierten (Abb. 26B). Die Mutationen spezifischer Aminosäurereste im RUNX1-Fusionsprotein begünstigen demnach das Überleben bzw. die Proliferation der 4-OHT behandelten Zellen. Diese Beobachtungen lieferten damit einen ersten Hinweis, dass die Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste im Runx1-Protein die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflussen könnte.

Für eine genauere Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der RUNX1-Phosphorylierungsmutanten sollte im Anschluss die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* auf mRNA-Ebene analysiert und mit der Aktivierung durch das unveränderte RUNX1-ERt2-Fusionsprotein (Wildtyp, WT) verglichen werden. Dazu wurden Zellen aller Zelllinien, die eine mutierte Form des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins sowie Zellen, die das unveränderte Fusionsprotein exprimierten, für 24 Stunden mit oder ohne 4-OHT kultiviert und anschließend die mRNA isoliert. Nach cDNA-Synthese erfolgte die Bestimmung der relativen Genexpressionslevel mithilfe von qRT-PCR-Analysen. Die Expressionsanalyse für die Mutanten, die durch fehlende Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste charakterisiert waren, ergab, dass die Mutationen der Aminosäurereste in Mutante B keine negative Auswirkung auf die Expression von *Ikzf3* oder *Spib*

zeigte. Die etwa 3-fach erhöhte Expression von *Ikzf3* nach 4-OHT-Zugabe war vergleichbar zum unveränderten Fusionsprotein. Die Expression von *Spib* war im Vergleich zur Überexpression des Wildtyps nach 4-OHT-Zugabe sogar leicht erhöht. Bei Expression dieser Mutante konnte eine 25-fach verstärkte Expression festgestellt werden, während die Aktivierung des unveränderten RUNX1-ERt2-Fusionsproteins nur zu einer 16-fach erhöhten Expression führte. Für die Mutante C hingegen konnte weder für *Ikzf3* noch für *Spib* eine verstärkte Expression nach Aktivierung durch Zugabe von 4-OHT detektiert werden. Dies traf für *Spib* auch bei der Aktivierung der Mutante A zu. Im Vergleich zur 16-fach verstärkten Expression bei Aktivierung des Wildtyp-Fusionsproteins war die nur 3,8-fach erhöhte Expression von *Spib* bei Aktivierung der Mutante A deutlich verringert. Die Mutationen dieser Aminosäurereste hatten demgegenüber keinen Einfluss auf die Expressionslevel von *Ikzf3* (Abb. 26C). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden diese Analysen in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

Neben den Expressionsdaten, die für die Aktivierung der zuvor genannten Mutanten erhalten wurden, wurden ebenfalls die relativen Expressionslevel von *Ikzf3* und *Spib* bei Überexpression der Mutanten 2B und 2C analysiert. Anhand dieser Mutanten sollte die konstitutive Phosphorylierung der Tyrosinreste in der Aktivierungs- bzw. Inhibierungsdomäne nachgeahmt werden. Es konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Expressionsänderungen von *Ikzf3* und *Spib* erhalten werden. In Abbildung 26D sind die jeweiligen Expressionsdaten von zwei voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt. Während im ersten Experiment für die Aktivierung beider Mutanten im Vergleich zur Aktivierung des Wildtyps erhöhte mRNA-Transkriptionslevels sowohl für *Ikzf3* als auch für *Spib* gezeigt werden konnten, konnte dies im zweiten experimentellen Ansatz nicht bestätigt werden. Für keine der Mutanten konnte eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression der Zielgene festgestellt werden. Hierfür könnte in diesen Mutanten die zu stark abweichende Struktur der Asparaginsäurereste im Vergleich zur Struktur der Tyrosinreste verantwortlich sein, sodass die korrekte Faltung des Fusionsproteins nicht konstant gewährleistet werden konnte und so transkriptionelle Aktivität in den durchgeführten Experimenten unterschiedlich beeinflusst wurde.

Zusammenfassend konnte durch die Etablierung von RUNX1-ERt2-Phosphorylierungsmutanten, die in verschiedenen Domänen des Runx1-Proteins lokalisiert waren, gezeigt werden, dass die Mutationen spezifischer Serinreste in der Aktivierungsdomäne (Mutante A) sowie spezifischer Tyrosinreste in der Inhibierungsdomäne (Mutante C) die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* unterschiedlich beeinflussten. Die Mutation spezifischer Tyrosinreste in der Aktivierungsdomäne (Mutante B) hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Expression der beiden Runx1-Zielgene im Vergleich zur Expressionsänderung der Zielgene nach Aktivierung des unveränderten RUNX1-ERt2-Fusionsproteins.

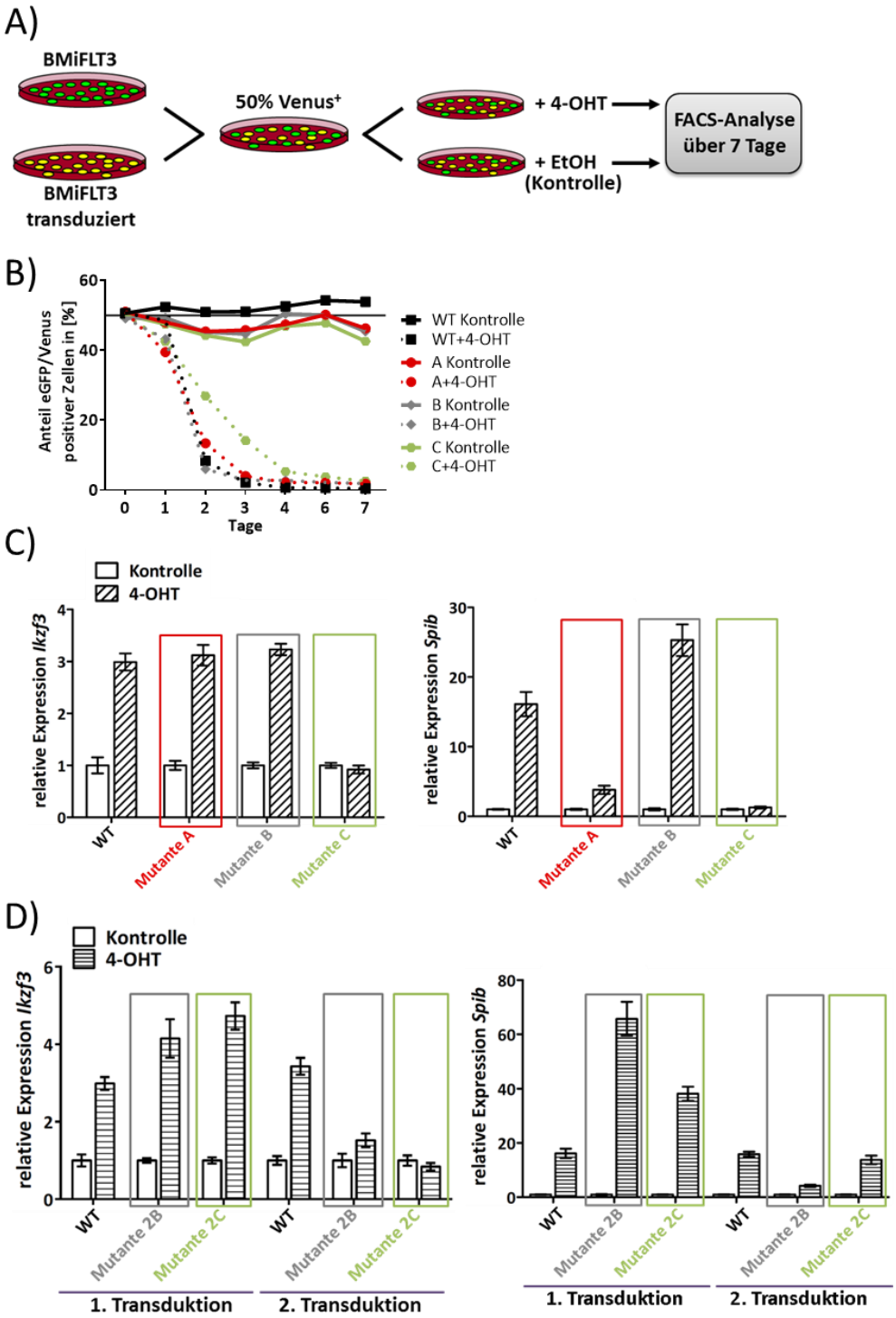


Abb. 26: Die Aktivierung der *Ikzf3*- und *Spib*-Expression ist von der Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein abhängig.
A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Für den Kompetitionsassay wurden jeweils eine Zellsuspension aus transfizierten ($GFP^+/Venus^+$) und nicht-transfizierten (GFP^+) BMiFLT3-Zellen hergestellt und diese in jeweils mit oder ohne 4-OHT kultiviert und der Anteil an $Venus^+$ Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. **B)** Kompetitionsanalyse der RUNX1-ERt2 bzw. der Phosphorylierungsmutanten überexprimierenden BMiFLT3-Zellen. Es wurde für jeden Ansatz eine Suspension aus transduzierten ($GFP^+/Venus^+$) und nicht-transduzierten (GFP^+) BMiFLT3-Zellen hergestellt, sodass der $Venus^+$-Anteil bei 50% lag. Die Zellen wurden über sieben Tage mit oder ohne 0,2 µM 4-OHT inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. **C)** Bestimmung der Transkriptlevel von *Ikzf3* und *Spib* mithilfe von qRT-PCR-Analysen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT inkubiert und anschließend die RNA isoliert. *Hprt* diente als Referenzgen. **D)** Versuchsdurchführung wie bei B), jedoch wurden die Überexpression der Mutanten 2B bzw. 2C untersucht. Im ersten Experiment konnte für beide Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp nochmals erhöhte Expression der beiden Runx1-Zielgene beobachtet werden (1. Transduktion), dieses Ergebnis konnte jedoch nicht wiederholt werden (2. Transduktion).

5.4.2.3 Die verstärkte Expression von Aiolos und Spi-B nach RUNX1-Überexpression kann durch spezifische Kinase-Inhibitoren relativiert werden

Um die Bedeutung der Runx1-Phosphorylierung für die transkriptionelle Aktivität des Proteins in frühen B-Zellvorläufern zu bestätigen, sollten in einem weiteren Experiment verschiedene Proteinkinase-Inhibitoren, die die Aktivität spezifischer Proteinkinase-Familien reprimieren, verwendet werden. Mithilfe dieser Inhibitoren sollte die Phosphorylierung des Runx1-Proteins unterbunden und die Auswirkung der fehlenden Runx1-Phosphorylierung auf die Regulation spezifischer Zielgene analysiert werden. Daher sollten solche Inhibitoren angewendet werden, die diejenigen Proteinkinasen reprimieren, die an der Signaltransduktion in frühen Prä-B-Zellen beteiligt sind und daher potentiell zur Phosphorylierung von Runx1 beitragen könnten. Zur Inhibierung der Tyrosinphosphorylierung wurde daher der Inhibitor PP2 verwendet, der laut Herstellerangaben (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt) selektiv die Aktivität von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie reprimiert. Die Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste im Runx1-Protein sollte durch Zugabe von zwei verschiedenen Inhibitoren geblockt werden. Beide Inhibitoren, UO126 sowie PD98059, reprimieren dabei Phosphorylierungen, die durch den MAPK-Signalweg katalysiert werden, genauer gesagt werden laut Herstellerangaben (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt) selektiv die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 inhibiert.

Für die beiden Inhibitoren des MAPK-Signalwegs sollte in einem ersten Experiment analysiert werden, ob die Verwendung dieser Inhibitoren tatsächlich die Phosphorylierungslevel von Runx1 in frühen B-Zellprogenitoren beeinflusst. Hierzu wurde die Prä-B-Zelllinie Oct#856 verwendet, die das induzierbare BLNK-ERt2-Fusionsprotein exprimierte. Um die Auswirkung der Inhibitoren zu analysieren, wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Inhibitor UO126 bzw. PD98059 prä-inkubiert. Für die Kontrollansätze wurde zu zwei weiteren Zellsuspensionen DMSO zugegeben und diese parallel zu den beiden ersten Ansätzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs in den Inhibitor-behandelten sowie in einem der Kontrollansätze durch Zugabe von 4-OHT und dem µHC-spezifischen Antikörper für 10 Minuten. Der zweite Kontrollansatz blieb unstimuliert. Auf die Extraktion der Proteine folgte die Westernbot-Analyse zur Detektion der Runx1-Phosphorylierungslevel, wobei hierfür wieder der Antikörper verwendet wurde, der spezifisch die Phosphorylierung des S249 erkennt. In unbehandelten Zellen führte die Aktivierung der BLNK-abhängigen Signalgebung zur einer verstärkten Runx1-Phosphorylierung im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen. Dieses erhöhte Phosphorylierungslevel konnte jedoch durch Verwendung beider Inhibitoren trotz Aktivierung des Prä-BZRs rückgängig gemacht und die Phosphorylierung von Runx1 im Vergleich zu nicht-aktivierten Zellen sogar noch stärker inhibiert werden (Abb. 27A).

Da im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, dass die Inhibitoren des MAPK-Signalwegs die Phosphorylierung von Runx1 reprimieren, sollte nun die Auswirkung dieser

fehlenden Phosphorylierung auf die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* analysiert werden. Dazu wurden BMiFLT3-Zellen verwendet, die mit dem γ-retroviralen Vektor, der für das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein kodierte, transduziert waren. Die Zellen wurden zunächst für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren UO126 oder PD98059 bzw. DMSO als Kontrolle prä-inkubiert und die Ansätze anschließend jeweils zweigeteilt, um einen Teil der Zellen mit 0,2 µM 4-OHT zu stimulieren, während der andere Teil der Zellen als Kontrolle diente und mit der entsprechenden Menge an EtOH versetzt wurde. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen erfolgte die RNA-Isolierung, die Umschreibung in cDNA und die Bestimmung der relativen Expressionslevel der Runx1-Zielgene mithilfe von qRT-PCR-Analysen. Hierbei konnte für die Expression von *Ikzf3* nicht eindeutig gezeigt werden, inwieweit die Inhibierung der Runx1-Phosphorylierung auch die Aktivierung der *Ikzf3*-Transkription beeinflusst (Abb. 27B und 27C). Denn auch in den nur mit DMSO behandelten Kontrollzellen war die Expression nach Aktivierung des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins nur zweifach und nicht wie in den voherigen Versuchen ohne DMSO-Zugabe dreifach erhöht (vgl. Abb. 26C). Die mit den Inhibitoren behandelten Zellen zeigten jedoch eine noch geringere bzw. gar keine verstärkte Expression dieses Gens, sodass dennoch eine Abhängigkeit der *Ikzf3*-Expression von der durch MAPK-vermittelten Phosphorylierung von RUNX1 angenommen werden konnte. Die Expression von *Spib* in den Inhibitor-behandelten Zellen war demgegenüber deutlich reprimiert. Während in den DMSO-behandelten Kontrollansätzen die Expression nach Aktivierung des Fusionsproteins etwa 13-fach verstärkt war, konnte für Zellen, die mit dem Inhibitor PD98059 behandelt waren, keine erhöhte Expression nach Aktivierung des Fusionsproteins detektiert werden (Abb. 27C). Auch für die Zellen, die vor Aktivierung mit dem Inhibitor UO126 prä-inkubiert wurden, konnte nahezu keine Veränderung in der Expression von *Spib* festgestellt werden. Bei der Verwendung beider Inhibitoren reichte dabei bereits die geringere Konzentration aus, um die Aktivierung der Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* vollständig zu reprimieren.

Um auch die Signalwege zu beeinflussen, die die Tyrosinphosphorylierungen vermitteln, wurde in einem weiteren Ansatz der Inhibitor PP2, der Mitglieder der Src-Kinase-Familie reprimiert, eingesetzt. Der experimentelle Aufbau war dabei mit dem oben bereits beschriebenen Ablauf für die Inhibitoren des MAPK-Signalwegs identisch. Die Analyse der Expressionslevel ergab deutliche Unterschiede in der Aktivierung der beiden Runx1-Zielgene (Abb. 27D). Für die Expressionsänderung von *Ikzf3* nach Stimulation des RUNX1-ERt2-Fusionsproteins konnte kein Unterschied zwischen DMSO- und PP2-Inhibitor-behandelten Zellen festgestellt werden. Für *Spib* hingegen konnte eine Repression der Genexpression nach Aktivierung der Zellen gezeigt werden, die von der Konzentration des PP2-Inhibitors abhing. Die relative Expressionsänderung von *Spib* in den mit dem PP2-Inhibitor behandelten Zellen war dabei im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um 50% reduziert, wies jedoch immer noch eine etwa 8,4-fach erhöhte Expression nach Aktivierung des Fusionsproteins auf.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Kinase-Inhibitoren in RUNX1-ERt2 überexprimierenden Pro-B-Zellen die verstärkte Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* nach Aktivierung des Zellsystems im Vergleich zu unbehandelten Zellen reprimiert war. Die Expression von *Spib* war dabei durch die Verwendung aller Kinase-Inhibitoren deutlich inhibiert, während die Expression von *Ikzf3* nur in geringem Umfang oder gar nicht durch den Einsatz der Inhibitoren beeinflusst war. Diese Beobachtungen belegen, dass spezifische Phosphorylierungen im Runx1-Protein die Aktivierung der beiden Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib* beeinflussen und liefern zudem erste Hinweise, dass diese Phosphorylierungen von Mitgliedern der MAPK- bzw. Src-Kinase-Familie durchgeführt werden.

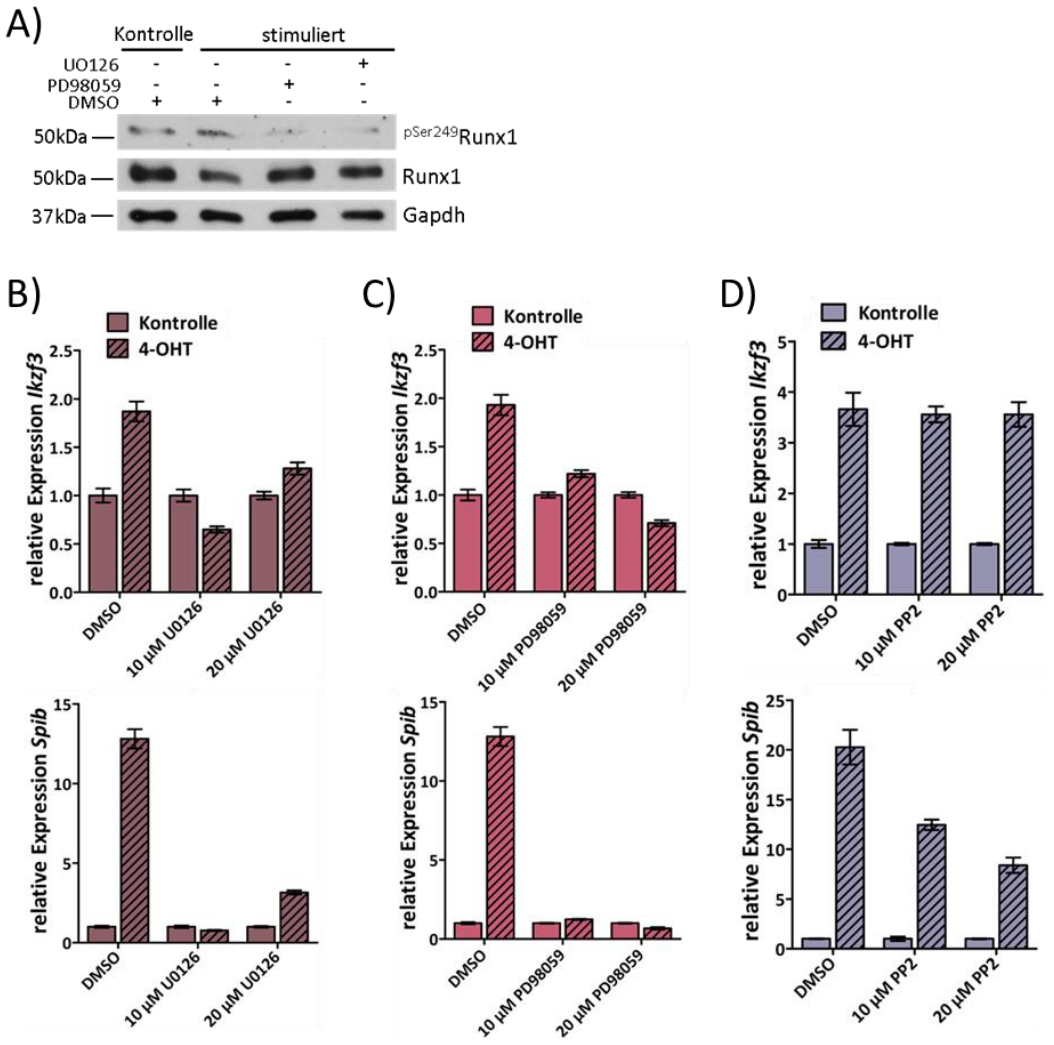


Abb. 27: Die transkriptionelle Aktivität von Runx1 kann durch Kinase-Inhibitoren verringert werden.
A) Westernblot-Analyse von stimulierten Oct#856-Zellen nach Inhibitor-Behandlung. Die Zellen wurden eine Stunde mit den Inhibitoren UO126 bzw. PD98059 prä-inkubiert und anschließend 10 min stimuliert. Nach ProteinIsolierung erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. **B),C) und D)** qRT-PCR-Analysen der *Ikzf3* und *Spib* Expression in RUNX1-ERt2 überexprimierenden BMiFLT3-Zellen nach Inhibitorbehandlung. Die Zellen wurden für eine Stunde mit dem jeweils entsprechenden Inhibitor prä-inkubiert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 0,2 µM 4-OHT oder EtOH als Kontrolle kultiviert, bevor die RNA isoliert wurde. Für die Normalisierung der cDNA-Proben wurden die Expressionslevel von *Hprt* bestimmt.

6 Diskussion

Die frühe B-Zellentwicklung unterliegt einer komplexen Regulation. Ein wichtiger Kontrollpunkt hierbei beinhaltet die Expression eines funktionalen Prä-B-Zellrezeptors (Prä-BZR) auf der Zelloberfläche früher Prä-B-Zellen und ist durch ein umfangreiches Zusammenspiel proliferations- und differenzierungsfördernder Signalwege gekennzeichnet. Fehlregulationen dieser Signalwege können die Entstehung einer Prä-B-zellspezifischen akuten lymphoiden Leukämie (Prä-B-ALL) begünstigen (Herzog et al., 2009). Interessanterweise kann in 25% aller ALLs, die einen Prä-B-zellspezifischen Differenzierungsblock aufweisen, die Translokation t(12;21) detektiert werden, die zur Expression des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins führt. Für dieses Fusionsprotein wird angenommen, dass es eine dominant-negative Inhibierung der RUNX1-Zielgene bewirkt (Zelent et al., 2004). Anhand von konditionalen *knockout* Mausmodellen konnte bestätigt werden, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors Runx1 für die Differenzierung der B-Vorläuferzellen essentiell ist (Ichikawa et al., 2004; Putz et al., 2006; Niebuhr et al., 2013). Trotz dieser Beobachtungen sind die genauen Funktionen von Runx1 während der frühen B-Zellentwicklung noch nicht im Detail untersucht.

Ziele dieser Arbeit waren daher, (1) den Differenzierungsblock der konditionalen *Runx1 knockout* Mäuse in der frühen B-Zellentwicklung genauer zu charakterisieren, (2) wichtige Zielgene zu identifizieren und (3) aufgrund der erhaltenen Ergebnisse die Aktivität von Runx1 in den B-zellspezifischen Vorläufern am Prä-BZR-Kontrollpunkt genauer zu analysieren. Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert und abschließend anhand der neugewonnenen Erkenntnisse Rückschlüsse auf die Rolle von RUNX1 bei der Entstehung einer Prä-B-ALL gezogen werden.

6.1 Runx1: ein wichtiger Transkriptionsfaktor stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung

6.1.1 Der Verlust der Runx1-Aktivität führt zu einem Differenzierungsblock in frühen Prä-B-Zellen

Um besser zu verstehen, in welchem Vorläuferstadium während der B-Zellentwicklung die Aktivität von Runx1 unerlässlich ist, wurde zunächst mittels durchflusszytometrischer Analysen der Block in der B-Zelldifferenzierung, der in *Runx1*-deletierten Mäusen auftritt, genauer charakterisiert. Durch die Optimierung der FACS-Strategie war es möglich, alle wichtigen B-Zellvorläuferpopulationen voneinander zu trennen. Die bedeutende Rolle des Transkriptionsfaktors Runx1 während der frühen B-Zellentwicklung wurde, wie bereits mehrfach erwähnt, schon anhand früherer Studien unterschiedlicher *Runx1 knockout* Mausmodelle unterstrichen und ein Block der Differenzierung in den frühen B-Zellvorläufern postuliert (Ichikawa et al., 2004; Growney et al., 2005; Putz et al., 2006; Niebuhr et al., 2013). Die genauere Analyse der unterschiedlichen Vorläufer-B-Zellpopulationen, die in *Runx1*-deletierten Mäusen noch nachgewiesen werden können, erfolgte jedoch erst im Rahmen dieser

Arbeit mithilfe des B6.*Runx1*$^{fl/fl}$*Cd79a*$^{hCre/1}$ Mausmodells. Bestimmte Vorläufer wie die frühen Prä-B-Zellen sind dabei besonders schwer nachzuweisen, da diese Prä-BZR exprimierenden Zellen während der B-Zellentwicklung nur innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes beim Übergang von Pro-B- in späte Prä-B-Zellen vorhanden sind. Sie differenzieren nach der Signaltransduktion durch den Prä-BZR schnell in späte Prä-B-Zellen ohne Prä-BZR-Expression (Jumaa et al., 2005). Anhand der Zellgröße und der Expressionsstärke des Oberflächenmarkers CD43 konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass bei Verlust von *Runx1* eine aberrante Population aus Pro-B- und frühen Prä-B-Zellen detektiert werden kann, jedoch keine späten Prä-B-Zellen mehr gebildet werden. Die Aktivität von Runx1 ist somit für die Differenzierung in späte Prä-B-Zellen unerlässlich. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen des hier verwendeten Mausmodells. So konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in der Rekombination und Expression des Immunglobulin-Locus, der für die schwere Kette des BZRs (IgH) kodiert, im Vergleich zu Kontrolltieren bestehen. Zudem werden auch alle weiteren Komponenten des Prä-BZR-Komplexes exprimiert. Darüber hinaus ist auch die stromabwärts des Prä-BZRs stattfindende Rekombination des Immunglobulin-Locus, der für die leichte Kette des BZRs (IgL) kodiert, nicht signifikant durch den Verlust der Runx1-Expression beeinflusst. IgL-Transkripte hingegen, die erstmals in späten Prä-B-Zellen exprimiert werden, können in diesen Mäusen nicht nachgewiesen werden (Niebuhr et al., 2013). Diese Ergebnisse zusammen mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten FACS-Analyse bestätigen die Hypothese, dass der Block in der Differenzierung bei Verlust der Runx1 Aktivität in den frühen Prä-B-Zellen, genauer gesagt stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung stattfindet, sodass späte Prä-B-Zellen nicht mehr entstehen können. Damit zeigen die konditionalen *Runx1 knockout* Mäuse einen Block in der B-Zelldifferenzierung, der vergleichbar mit dem Differenzierungsdefekt ist, der auch in ETV6-RUNX1 exprimierenden Prä-B-ALLs auftritt.

6.1.2 Zwei Gruppen von Zielgenen beeinflussen den Block in der frühen B-Zelldifferenzierung und werden stromabwärts des Prä-BZRs aktiviert

Zur genaueren Charakterisierung der Rolle von Runx1 in der frühen B-Zellentwicklung wurden in den weiteren Versuchen Zielgene identifiziert, deren Fehlregulationen zu dem oben beschriebenen Block in der B-Zelldifferenzierung beitragen könnten. Eine Liste von bereits zuvor identifizierten potentiellen Runx1-Zielgenen (Kriebitzsch, Masterarbeit 2011) wurde dazu genauer auf Funktion und Expressionsmuster während der frühen B-Zellentwicklung hin untersucht. So wurden zwei Gruppen von interessanten Zielgenen identifiziert, die den Differenzierungsblock beeinflussen könnten. Diese umfassten Mitglieder der Subfamilie der Lyn-Src-Kinasen sowie die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B (durch die Gene *Ikzf3* bzw. *Spib* kodiert). Für diese Gene wurde nachgewiesen, dass Runx1 als transkriptioneller Aktivator dient und anhand von ChIP-Analysen wurde gezeigt, dass Runx1 die Expression dieser Gene durch direkte Bindung an die genomischen Loci reguliert. Weiterhin wiesen die

beiden Transkriptionsfaktoren sowie die Lyn-Src-Kinasen Hck und Blk eine erhöhte Expression in der Prä-B-Zellpopulation auf. Für *Ikzf3* und *Spib* konnte weiterhin anhand verschiedener induzierbarer Zellsysteme bestätigt werden, dass die verstärkte Expression nach Aktivierung des Prä-BZRs erfolgte. Diese Beobachtungen lieferten damit einen wichtigen Hinweis, dass die verstärkte Expression dieser Gene für die weiteren Differenzierungsschritte essentiell sein könnte.

Doch inwiefern kann eine Fehlregulation der hier näher untersuchten Gene die Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen beeinträchtigen? Die Expression eines funktionalen Prä-BZRs auf der Zelloberfläche der frühen Prä-B-Zellen kennzeichnet den ersten wichtigen Kontrollpunkt während der frühen B-Zelldifferenzierung. Hat eine erfolgreiche Rekombination und Expression des IgH-Locus stattgefunden, wird durch ein komplexes Zusammenspiel der Signalgebungen durch den IL-7-Rezeptor (IL-7R) und durch den Prä-BZR die Proliferation sowie die weitere Differenzierung dieser Zellen beeinflusst. Der Eintritt in den Zellzyklusarrest und die Beendigung der Prä-BZR-Signalgebung stellen dabei wichtige Prozesse dar, die für die weitere Differenzierung in späte Prä-B-Zellen unerlässlich sind (Clark et al., 2014). Diese Mechanismen können in den *Runx1*-deletierten Mäusen jedoch nicht mehr gewährleistet werden und müssen daher durch in dieser Arbeit identifizierte Runx1-Zielgene reguliert werden.

Für Mitglieder der Familie der Lyn-Src-Kinasen ist dabei bereits beschrieben, dass sie an der Signaltransduktion durch den IL-7R sowie durch den Prä-BZR in den frühen Prä-B-Zellen beteiligt sind, die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt. Stromabwärts des IL-7Rs wird für die Lyn-Src-Kinasen angenommen, dass sie an der Aktivierung der STAT-Proteine beteiligt sind und so unter anderem die Proliferation der Vorläuferzellen beeinflussen (Corfe & Paige, 2012). Auch nach Aktivierung des Prä-BZRs scheinen die Mitglieder der Lyn-Src-Kinase-Familie die Expansion der B-Zellprogenitoren zu regulieren, wobei ein möglicher Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor* kappa B) beinhaltet (Saijo et al., 2003). Aber auch die weitere Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen wird z.B. durch Initiierung der IgL-Rekombination gefördert (Tretter et al., 2003). Hierbei werden zum Teil redundante Funktionen für Mitglieder der Src-Kinase-Familie innerhalb dieser Vorläuferpopulationen postuliert. So beeinflusst der Funktionsverlust von einzelnen oder zwei Mitgliedern der Src-Kinase-Familie in verschiedenen Mausmodellen nicht die Proliferation und Differenzierung der Pro-B- und Prä-B-Zellpopulationen (Lowell et al., 1994; Nishizumi et al., 1995; Texido et al., 2000). In einem dreifach-*knockout* Mausmodell ($Blk^{-/-}/Fyn^{-/-}/Lyn^{-/-}$) hingegen konnte eine deutliche Reduzierung an späten Prä-B- und unreifen B-Zellen festgestellt werden (Saijo et al., 2003). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Runx1 die Expression gleich mehrerer Mitglieder der Lyn-Src-Kinase-Familie aktiviert. Folglich kann die fehlende Aktivierung der Lyn-Src-Kinasen bei Verlust der Runx1-Funktion in dem hier analysierten

Mausmodell nicht kompensiert werden, sodass die Differenzierung der Vorläuferzellen beim Übergang in späte Prä-B-Zellen beeinträchtigt sein könnte.

Die zweite Gruppe der in dieser Arbeit identifizierten Zielgene umfasste die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B, die beide nach Aktivierung des Prä-BZRs deutlich verstärkt exprimiert wurden. Aiolos gehört zur Ikaros-Familie der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Es ist bereits beschrieben, dass die Expression von Aiolos für die Herunterregulation von *Igll1*, einer Komponente der Ersatz-leichten Kette, essentiell ist und weiterhin zusammen mit Ikaros die Proliferation der frühen Prä-B-Zellen negativ beeinflusst. Hierdurch trägt Aiolos zur Beendigung der Prä-BZR-Signalgebung bei und fördert so die weitere Differenzierung der Prä-B-Zellen am Prä-BZR-Kontrollpunkt (Thompson et al., 2007; Ma et al., 2010). Dabei scheinen Aiolos und Ikaros trotz großer Homologie und Binding an das gleiche Konsensusmotiv in der DNA hauptsächlich nicht-redundante Funktionen in der Prä-B-Zelldifferenzierung aufzuweisen (Joshi et al., 2014; Schwickert et al., 2014). So konnte anhand der hier vorliegenden Arbeit Runx1 als einer der entscheidenden Faktoren für die spezifische Aktivierung der *Ikzf3*-Expression stromabwärts des Prä-BZRs nachgewiesen werden und aufgrund des identifizierten Blocks in der B-Zelldifferenzierung in *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäusen die Annahme bestätigt werden, dass die Expression von *Ikzf3* die weitere Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen begünstigt.

Der Transkriptionsfaktor Spi-B hingegen gehört zur Familie der ETS-Faktoren, zu der auch der für die lymphoide Entwicklung unabdingbare Transkriptionsfaktor PU.1 zählt, der durch das Gen *Sfpi1* kodiert wird. Beide Faktoren weisen in der für die DNA-Bindung verantwortlichen ETS-Domäne eine starke Homologie auf und binden an identische Sequenzmotive in der DNA, sodass zum Teil redundante Funktionen innerhalb der Hämatopoese angenommen werden (Ray et al., 1992). Im Einklang damit kann weder in *Sfpi1*$^{fl/fl}$*-Cd19cre knockout* Mausmodellen noch bei Verlust der *Spib*-Expression ein Defekt in der Differenzierung der Prä-B-Zellvorläufer detektiert werden (Su et al., 1997; Polli et al., 2005). Demnach scheinen beide Transkriptionsfaktoren die Funktionen des anderen zu kompensieren, sodass weiterhin unreife B-Zellen im Knochenmark entstehen können. Durch Analyse verschiedener doppel-*knockout* Mausmodelle konnte jedoch gezeigt werden, dass bei einem Funktionsverlust beider Faktoren diese Kompensationseffekte aufgehoben werden. Weiterhin wurde ein Block in der Differenzierung im Prä-B-Zellstadium festgestellt. So konnte anhand dieser Analysen gezeigt werden, dass Spi-B/PU.1 an der Signalgebung stromabwärts des Prä-BZRs beteiligt sein müssen und hierdurch die weitere Differenzierung der Zellen beeinflussen. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt (Garrett-Sinha et al., 1999; Sokalski et al., 2011; Xu et al., 2012). Demgegenüber werden jedoch auch nicht-redundante Funktionen dieser beiden Transkriptionsfaktoren in B-Zellvorläufern diskutiert. So kann Spi-B in *Sfpi1*-defizienten embryonalen Stammzellen nicht den Verlust des Transkriptionsfaktors PU.1 kompensieren und folglich nicht die Entwicklung von B-Zellen ermöglichen. Zudem zeigt die N-terminale Domäne von Spi-B, die zur

Transaktivierung der Zielgene beiträgt, bei Vergleich zu PU.1 nur eine Homologie von 20%. Genauere Analysen der Spi-B-Proteindomänen identifizierten zudem Spi-B-spezifische Transaktivierungsdomänen und Unterschiede in den DNA-Bindungsaffinitäten beider Transkriptionsfaktoren (Rao et al., 1999; Garrett-Sinha, 2001; Dahl et al., 2002). PU.1 und Spi-B scheinen demnach nicht nur gemeinsame Zielgene in den verschiedenen B-Zellpopulationen zu regulieren, sondern auch weitere zellspezifische Funktionen aufzuweisen. Diese Beobachtungen werden auch durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützt. So scheint Runx1 in diesem Mausmodell in den frühen Prä-B-Zellen gezielt die Expression von *Spib* zu regulieren, die Transkriptlevel von PU.1 hingegen sind nicht alteriert, obwohl für PU.1 bereits eine Regulation durch Runx1 beschrieben ist (Huang et al., 2008). Weiterhin scheint PU.1 in diesem Mausmodell nicht die fehlende Hochregulation von Spi-B nach Aktivierung des Prä-BZRs kompensieren zu können. Die Runx1-anhängige Erhöhung der *Spib*-Expression am Prä-BZR-Kontrollpunkt scheint damit spezifisch und für die Regulation nachgeschalteter Zielgene essentiell zu sein. Die Deregulation von *Spib* könnte somit zusammen mit weiteren Runx1-Zielgenen zu dem in dieser Arbeit identifizierten Differenzierungsblock im frühen Prä-B-Zellstadium beitragen. Weitere Analysen zu Spi-B- und PU.1-Zielgenen in den Prä-B-Zellvorläufern könnten dabei mehr Informationen über redundante und nicht-redundante Funktionen beider Transkriptionsfaktoren bereitstellen und wären auch für das genaue Verständnis der Prä-B-Zelldifferenzierung von großer Bedeutung.

6.1.3 Runx1 reguliert seine Zielgene durch Bindung an *Enhancer*-Elemente

Mithilfe einer genomweiten DNA-Bindungsanalyse wurden in der hier vorliegenden Arbeit Runx1-Bindungsstellen in frühen B-Zellvorläufern identifiziert. 4327 genomische Loci wiesen Runx1-Bindungen auf, wobei die Mehrheit der Bindungsstellen in putativen *Enhancer*-Regionen gefunden wurde. Im Gegensatz zu Promotorelementen, die direkt an der Transkriptionsstartstelle (TSS) zu finden sind, können regulatorische wirkende *Enhancer* auch mehrere 100 kb von der TSS entfernt lokalisiert sein und trotzdem die Transkription der jeweiligen Zielgene an der TSS beeinflussen. Bestimmte Histonmodifizierungen und die Kooperation von mehreren Transkriptionsfaktoren sowie weiteren Ko-Faktoren sind dabei für *Enhancer*-Elemente charakteristisch (Bulger & Groudine, 2011). So waren einige der Runx1-gebundenen *Enhancer*-Bereiche in dieser Arbeit durch *Enhancer*-assoziierte H3K4me1-Histonmodifizierungen und die Ko-Lokalisation des B-zellspezifischen Transkriptionsfaktors E2A gekennzeichnet. Die bevorzugte Bindung von Runx1 an *Enhancer*-Elemente in der DNA konnte bereits in anderen Zellen der Hämatopoese, wie multipotenten Vorläufern oder Megakaryozyten, gezeigt werden (Wilson et al., 2010; Pencovich et al., 2013). Die Bindung von Runx1 an *Enhancer* könnte somit in der Hämatopoese ein allgemeines Merkmal darstellen, wie Runx1 die Transkription seiner Zielgene reguliert.

Darüber hinaus scheint die Bindung von Transkriptionsfaktoren an *Enhancer*-Bereiche eine zelltypspezifische Regulation der Genexpression zu unterstützen. So konnte durch Analysen der PU.1-Bindung in unterschiedlichen Zelllinien gezeigt werden, dass die Bindung an die distal gelegenen *Enhancer*-Bereiche sehr zelltypspezifisch erfolgte und durch die Ko-Lokalisation mit bestimmten Transkriptionsfaktoren sowie weiteren Ko-Faktoren charakterisiert war. Für die Bindung von PU.1 an Promotorelemente konnten solche spezifischen Ko-Lokalisationen hingegen nicht bestätigt werden (Heinz et al., 2010). Weitere Hinweise auf zellspezifische Funktionen von *Enhancer*-Elementen wurden außerdem durch Bindungsstudien der verschiedenen ETS-Faktoren erhalten. Während redundante Bindungen gleich mehrerer ETS-Faktoren an Promotorelementen gefunden wurden, waren *Enhancer*-Elemente durch die Bindung einzelner, spezifischer ETS-Faktoren gekennzeichnet (Hollenhorst et al., 2007). Demnach könnte auch die Bindung von Runx1 an *Enhancer*-Elemente besonders die Regulation zelltypspezifischer Gene bewirken und so gezielt die weitere Differenzierung der B-Vorläuferzellen unterstützen.

Doch wie kann die Bindung von Runx1 an distal gelegene *Enhancer*-Bereiche in der DNA die Transkription, die an der TSS eines Gens beginnt, direkt beeinflussen? Das Genom liegt nicht in einer linearen Struktur vor, sondern ist durch ein komplexes Netzwerk chromosomaler Interaktionen gekennzeichnet, durch die unter anderem die Transkription bestimmter genomischer Loci reguliert werden kann. So kann eine Interaktion von *Enhancer*- und Promotorbereich zum Beispiel die Rekrutierung weiterer Komponenten des Transkriptionskomplexes zur TSS bewirken (Dekker, 2008). Durch die Analyse möglicher Interaktionen zwischen einzelnen DNA-Bereichen des *Ikzf3*-Genlocus wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein *Looping* zwischen dem Runx1-bindenden *Enhancer*-Element und 90 kb stromaufwärts gelegenen, nah am Promotor lokalisierten DNA-Bereichen identifiziert. Zusätzlich konnte die Bindung einer Reihe weiterer B-zellspezifischer Transkriptionsfaktoren sowie die Bindung des Ko-Aktivators p300 am *Enhancer*-Bereich im *Ikzf3*-Locus festgestellt werden. Interessanterweise konnte anhand einer genomweiten Analyse von chromosomalen Interaktionen in Pro-B-Zellen bereits gezeigt werden, dass diese häufig durch die Ko-Lokalisation der B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren E2A und Pax5 sowie der Histonacetyltransferase p300 im Bereich der *Enhancer*-Elemente charakterisiert sind (Lin et al., 2012). Im *Ikzf3*-Locus könnte Runx1 demnach als ein weiterer Faktor in diesem Komplex lokalisiert sein, die Konformationsänderung dieses DNA-Bereichs unterstützen und so entscheidend zur Aktivierung der *Ikzf3*-Expression am Promotorbereich beitragen. Denn nur nach Überexpression von Runx1 wurde das erhöhte Transkriptionslevel von *Ikzf3* in der hier untersuchten Pro-B-Zelllinie gemessen. Die Bindung von Runx1 im *Enhancer*-Bereich könnte dabei für das *Looping* dieses DNA-Bereichs essentiell sein oder auch die Rekrutierung weiterer wichtiger aktivierender Ko-Faktoren am Promotorbereich bewirken und so die Transkription verstärken. Dabei wäre es interessant anhand von genomweiten Interaktionsanalysen von Runx1-gebundenen

Enhancer-Bereichen zu untersuchen, ob das DNA-*Looping* einen allgemeinen Mechanismus der transkriptionellen Regulation durch Runx1 darstellt.

6.2 Die Regulation der Runx1-Aktivität in frühen B-zellspezifischen Progenitoren

Aufgrund der Prä-B-zellspezifischen Aktivierung der Runx1-Zielgene am Prä-BZR-Kontrollpunkt wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivität von Runx1 stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung gezielt verstärkt wird. Doch wie kann dies trotz der gleichbleibenden Expression von Runx1 erreicht werden? Zwei verschiedene Möglichkeiten, wie die Aktivität von Runx1 reguliert werden könnte, soll dazu in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Zum einen besteht die bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnte Möglichkeit, dass durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und/oder weiteren Ko-Faktoren die Transkription spezifischer Gene aktiviert oder reprimiert werden könnte. Zum anderen könnte durch posttranslationale Modifikationen die transkriptionelle Aktivität von Runx1 selbst beeinflusst werden.

6.2.1 Die Aktivierung spezifischer Zielgene in frühen Prä-B-Zellen wird durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht

Die nähere Analyse der in dieser Arbeit identifizierten genomweiten Runx1-Bindungsstellen erfolgte unter anderem durch die *de novo* DNA-Bindungsmotiv-Suche und durch den Vergleich mit ChIP-Daten weiterer B-zellspezifischer Transkriptionsfaktoren, die bereits in Pro-B-Zellen generiert wurden. So wurde zunächst festgestellt, dass Runx1 in der hier verwendeten Pro-B-Zelllinie direkt an die DNA der Zielgene bindet, denn alle untersuchten DNA-Bereiche, die eine Anreicherung von Runx1 aufwiesen, waren auch durch ein Runx1-DNA-Bindungsmotiv gekennzeichnet. Die Bindung von Runx1 allein ist meist jedoch für die transkriptionelle Regulation seiner Zielgene nicht ausreichend, da Runx1 als relativ schwacher transkriptioneller Aktivator beschrieben ist und erst durch Kooperation mit weiteren Faktoren eine deutliche Regulation seiner Zielgene bewirkt (Perry et al., 2002). Eine komplexe Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren konnte dabei bereits unter anderem im T-Zellkompartiment sowie auch im myeloiden Zweig der Hämatopoese festgestellt werden (Collins et al., 2009; Pencovich et al., 2011).

Die Interaktion mit verschiedenen Ko-Faktoren kann dabei nicht nur die Aktivität, sondern auch die Spezifität eines Transkriptionsfaktors beeinflussen und garantiert so die gezielte Regulation nur bestimmter Gene in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien (zusammengefasst in: (Spitz & Furlong, 2012)). Für das Gen *Sfpi1*, das für den Transkriptionsfaktor PU.1 kodiert, ist eine solche zelltypspezifische Regulation bereits bekannt. Die Aktivierung eines stromaufwärts gelegenen *Enhancer*-Elements erfolgt in myeloiden Zellen und B-Zellen durch Interaktion verschiedener linienspezifischer Transkriptionsfaktoren, sodass je nach Zelltyp eine differentielle Aktivierung des

Sfpi1-Locus und letztendlich eine differenzielle Expression von PU.1 in den unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen erreicht wird (Leddin et al., 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten Ko-Lokalisationen von Runx1-gebundenen Regionen mit mehreren B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie E2A, Pax5 und Ebf1 sowie mit dem DNA-Bindungsmotiv für die ETS-Faktoren Spi-B/PU.1 identifiziert werden. Die erstgenannten Transkriptionsfaktoren stellen dabei potentielle Runx1-Bindungspartner in Pro-B- und beim Übergang in frühe Prä-B-Zellpopulationen dar. Für diese Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie ein komplexes Netzwerk zur transkriptionellen Regulation der B-Zellspezifikation und B-Zellreifung bilden (Lin et al., 2010). Doch wo ist Runx1 in diesem Netzwerk lokalisiert? Eine wichtige Interaktion in den B-Zellvorläufern könnte mit Pax5 stattfinden. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Runx1 und Pax5 gemeinsam die Aktivierung von *Blk* regulieren (Libermann et al., 1999). Interessanterweise konnte darüber hinaus für den Transkriptionsfaktor Pax5 in einer weiteren Studie anhand von Genexpressionsanalysen in *Pax5*-deletierten Pro-B-Zellen gezeigt werden, dass Pax5 auch als transkriptioneller Aktivator für *Ikzf3* und *Spib* wirkt (Pridans et al., 2008), die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Zielgene von Runx1 identifiziert wurden. Insgesamt zeigten 22% aller Runx1-gebundenen Regionen eine Ko-Lokalisation mit Pax5. So konnte auch für die Gen-Loci, die für Aiolos und die näher untersuchten Mitglieder der Lyn-Src-Kinase-Familie kodieren, eine Ko-Lokalisation mit Pax5 bestätigt werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Interaktion von Runx1 und Pax5 in frühen B-Zellvorläufern einen allgemeinen Mechanismus darstellt, wodurch die Expression einer Reihe von gemeinsamen Zielgenen aktiviert und die weitere Differenzierung vorangetrieben wird. Weiterhin konnten Hinweise auf eine Ko-Lokalisation in *cis*-Elementen mit E2A und Ebf1 bereits zuvor für Runx1 durch Analyse von DNA-Bindungsmotiven in E2A-defizienten Pro-B-Zellen gefunden (Lin et al., 2010) und diese somit anhand der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Zusammenfassend kann postuliert werden, dass Runx1 durch Interaktionen mit den oben genannten Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle in der frühen B-Zellentwicklung einnimmt und die Transkription Pro-B- und früher Prä-B-zellspezifischer Gene in den frühen Vorläuferstadien fördert.

Nach der Kooperation von Runx1 mit den zuvor genannten Transkriptionsfaktoren, die zur Aktivierung von frühen Prä-B-zellspezifischen Genen wie *Ikzf3* und *Spib* beigeträgt, reguliert Runx1 im weiteren Verlauf der Prä-B-Zelldifferenzierung durch gezielte Interaktionen mit anderen Prä-B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren weitere Zielgene. So konnten interessanterweise anhand der in dieser Arbeit generierten ChIP-Daten in 20% aller Runx1-gebundenen Regionen DNA-Bindemotive für Spi-B/PU.1 gefunden werden. Runx1 könnte somit stromabwärts des Prä-BZRs spezifisch mit Spi-B interagieren und die Expression weiterer zelltypspezifischer Zielgene beeinflussen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Identifizierung eines speziellen ETS/Runx1-Motivs in der

DNA, für das gezeigt werden konnte, dass es eine kooperative Bindung beider Faktoren begünstigt (Hollenhorst et al., 2007). Darüber hinaus rekrutiert Spi-B stromabwärts des Prä-BZRs den ebenfalls Prä-B-zellspezifischen Transkriptionsfaktor Irf-4 zu sogenannten ETS-IRF *composite elements* (EICE) in der DNA und unterstützt so die weitere Differenzierung in unreife B-Zellen (Brass et al., 1999; Lu et al., 2003). Irf-4 begünstigt zudem die Expression von *Ikzf3* (Ma et al., 2008), die bereits durch Runx1 stromabwärts des Prä-BZRs induziert wurde. Hier könnte also eine weitere mögliche Kooperation von Runx1 mit Prä-B-zellspezifischen Faktoren zur Regulation nachgeschalteter Zielgene vorliegen. Weiterhin wird deutlich, dass auch die spätere Prä-B-Zelldifferenzierung durch ein komplexes Netzwerk mehrerer Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

Insgesamt kann also ein zelltypspezifischer Wechsel der Runx1-Interaktionspartner postuliert werden. Während Runx1 in den frühen B-Vorläufern mit Transkriptionsfaktoren wie E2A und Pax5 interagiert, könnten spätere Vorläuferstadien durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie Spi-B oder Irf-4 gekennzeichnet sein. Dieser Wechsel gewähreistet die Expression zelltypspezifischer Runx1-Zielgene und somit die Entstehung unreifer B-Zellen im Knochenmark.

6.2.2 Die Phosphorylierung von Runx1 stromabwärts des Prä-BZRs führt zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität

Mithilfe von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) können die Funktionen eines Proteins auch nach der Translation noch beeinflusst werden, sodass sie eine weitere wichtige Regulationsmöglichkeit für Proteine darstellen. Je nach PTM kann die Aktivität und Lokalisation aber auch die Stabilität des jeweiligen Proteins verändert werden. Ebenfalls können Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst werden. Bezogen auf Transkriptionsfaktoren können PTMs eine Veränderung der Expression bestimmter Zielgene zur Folge haben. Die transkriptionelle Aktivität von Runx1 ist dabei besonders von der Phosphorylierung, aber auch von der Acetylierung und Methylierung bestimmter Aminosäurereste abhängig (Goyama et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein näher untersucht. Die Analyse der Phosphorylierungslevel von Runx1 vor und nach Prä-BZR-Signaltransduktion, die Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten sowie die Verwendung von spezifischen Kinase-Inhibitoren zeigten, dass Runx1 nach Aktivierung des Prä-BZRs erhöhte Phosphorylierungslevel aufwies und die Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste die Transkription der Zielgene *Ikzf3* und *Spib* beeinflusste.

Die Regulation der transkriptionellen Aktivität in Abhängigkeit von der Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste im Runx1-Protein wurde bereits in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Inwiefern die Phosphorylierung die Aktivität von Runx1 speziell in B-Zellvorläufern beeinflusst, ist jedoch noch nicht genauer analysiert. Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der Runx1 Phosphorylierung auf die Transkription der Zielgene *Ikzf3* und *Spib* untersucht. Durch

Herstellung von verschiedenen Phosphorylierungsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von spezifischen Aminosäureresten in der Aktivierungsdomäne als auch in der C-terminal gelegenen Inhibierungsdomäne des Runx1-Proteins aktivierend auf die Transkription der Zielgene *Ikzf3* und *Spib* wirkt.

Für die Aminosäurereste in der Aktivierungsdomäne (S249, S266, S276 sowie T273) konnte bereits mehrfach mithilfe von *in vitro* Studien festgestellt werden, dass die Phosphorylierung dieser Reste die transkriptionelle Aktivität von Runx1 fördert. Diese kann in Abhängigkeit der Proteinkinase Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) stromabwärts des MAPK-Signalwegs stattfinden und wurde in Fibroblastenzellen sowie in myeloiden Zellen bestätigt (Tanaka et al., 1996; Zhang et al., 2004). Die Phosphorylierung der Reste S249 und S266 scheint dabei die Interaktion mit dem Ko-Repressor Sin3A zu beenden und so die transkriptionelle Aktivität zu verstärken (Imai et al., 2004). Weiterhin vermittelt auch die Proteinkinase HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) eine Phosphorylierung der Reste S249, S276 und T273, bewirkt so die Rekrutierung des Ko-Aktivators p300 an die DNA und folglich die verstärkte Aktivierung der Runx1-Zielgene (Wee et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun auch in B-Zellen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung dieser Reste für die transkriptionelle Aktivität von Runx1 essentiell ist und sehr spezifisch zu wirken scheint. So wurde bei Mutation dieser Aminosäurereste nur die Expression von *Spib* beeinträchtigt, nicht aber die von *Ikzf3* beeinflusst. Möglicherweise ist diese Spezifität auf die unterschiedlichen Strukturen der *Enhancer*-Elemente der beiden Gene zurückzuführen, da diese die Interaktion mit weiteren Ko-Faktoren unterschiedlich beeinflussen könnten (Spitz & Furlong, 2012). So könnte nur im *Spib*-Locus die Rekrutierung bestimmter Ko-Aktivatoren aufgrund der Runx1-Phosphorylierung ermöglicht werden, die Phosphorylierung von Runx1 im *Ikzf3-Enhancer* hingegen begünstigt die Bindung weiterer Ko-Faktoren nicht. Die Kinase-Inhibitorversuche konnten zudem belegen, dass die Serin-Phosphorylierung von Runx1 vom bereits beschriebenen vom MAPK-Signalweg abhängig war (Abb. 28).

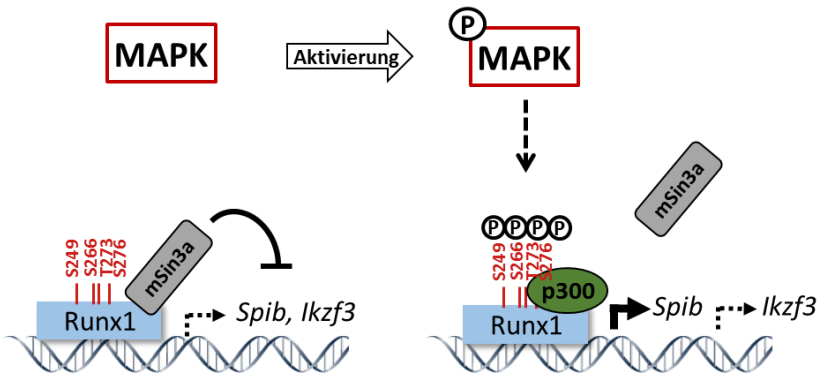


Abb. 28: Die transkriptionelle Aktivierung von Runx1 in Abhängigkeit vom MAPK-Signalweg.
Bei Aktivierung des MAPK-Signalwegs werden spezifische Aminosäurereste in der Aktivierungsdomäne des Runx1-Proteins phosphoryliert. Der Ko-Repressor dissoziiert vom Runx1-Protein und gleichzeitig können Ko-Aktivatoren wie p300 rekrutiert werden. Hierdurch wird die Transkription von *Spib* spezifisch aktiviert.

Für die Tyrosinreste in der Inhibierungsdomäne (Y375, Y378, Y379 und Y386) konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass ihre Phosphorylierung ebenfalls die Aktivität von Runx1 beeinflusst. Die Phosphorylierung wird dabei von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie katalysiert. In dieser Studie bewirkt die Phosphorylierung der Tyrosinreste eine Inhibierung der normalen Runx1-Funktion, die Differenzierung von Megakaryozyten und T-Zellen ist beeinträchtigt. Es wird angenommen, dass aufgrund veränderter Protein-Protein-Interaktionen die Aktivität von Runx1 reprimiert wird (Huang et al., 2012). Im Gegensatz dazu wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von Runx1 bei Phosphorylierung der genannten Tyrosinreste identifiziert. Dies könnte durch eine linienspezifische Regulation der Runx1-Aktivität erklärt werden. So könnten in B-Zellen durch Phosphorylierung dieser Reste andere Faktoren rekrutiert werden, die die transkriptionelle Aktivität von Runx1 stabilisieren. Weiterhin ist auch eine phosphorylierungsbedingte Dissoziation reprimierender Ko-Faktoren denkbar, die in dieser Domäne von Runx1 binden. So ist bereits für andere Aminosäurereste in der Inhibierungsdomäne beschrieben, dass eine Phosphorylierung die Interaktion mit den Histondeacetyltransferasen 1 und 3 (HDAC 1 und 3) reduziert und so die Runx1-Aktivität verstärkt wird (Guo & Friedman, 2011). Interessanterweise deuteten die in dieser Arbeit durchgeführten Kinase-Inhibitorversuche zudem daraufhin, dass die Tyrosinphosphorylierung von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie abhängig ist und bestätigen damit die bereits zuvor postulierte Rolle der Src-Kinasen bei der Phosphorylierung der Tyrosinreste in der Inhibierungsdomäne (Huang et al., 2012). Die in dieser Arbeit untersuchte Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Inhibierungsdomäne aktivierte dabei, im Gegensatz zu der Serin/Threonin-Phosphorylierung in der Aktivierungsdomäne, die Expression beider analysierten Transkriptionsfaktoren und unterstreicht damit erneut die komplexe, jedoch sehr spezifische Regulation der Runx1-Aktivität (Abb. 29).

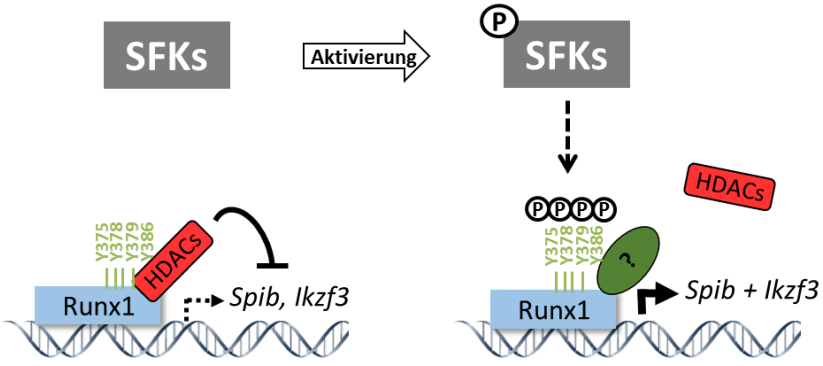


Abb. 29: Die transkriptionelle Aktivierung von Runx1 in Abhängigkeit von Src-Kinasen.
Die Aktivierung der Src-Kinasen bewirkt die spezifische Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im Runx1-Protein. Hierdurch könnte die Bindung von Ko-Repressoren wie HDACs vermindert werden. Gleichzeitig könnten aktivierende Ko-Faktoren rekrutiert werden und diese zusammen mit Runx1 die Expression spezifischer Zielgene wie *Spib* und *Ikzf3* regulieren.

Zusammengefasst konnte anhand dieser Ergebnisse erstmals nachgewiesen werden, dass die transkriptionelle Aktivität von Runx1 auch in B-Zellen von der Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste abhängt. Diese Phosphorylierungen von Runx1 finden nach Aktivierung bestimmter Prä-BZR-Signalwege ab und induzieren die Transkription spezifischer Runx1-Zielgene. Dabei scheinen sowohl der MAPK-Signalweg als auch die durch Src-Kinasen vermittelte Phosphorylierung für die Modifizierung spezifischer Aminosäurereste verantwortlich zu sein. Die Komplexität der Regulation der Runx1-Aktivität wird ebenfalls deutlich, da die Phosphorylierung einzelner Aminosäurereste die Transkription unterschiedlicher Zielgene bewirkt. *Ikzf3* und *Spib* sind hierbei zwei der wichtigsten Zielgene, die stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung durch Runx1 induziert werden und so die weitere Differenzierung fördern (Abb. 30).

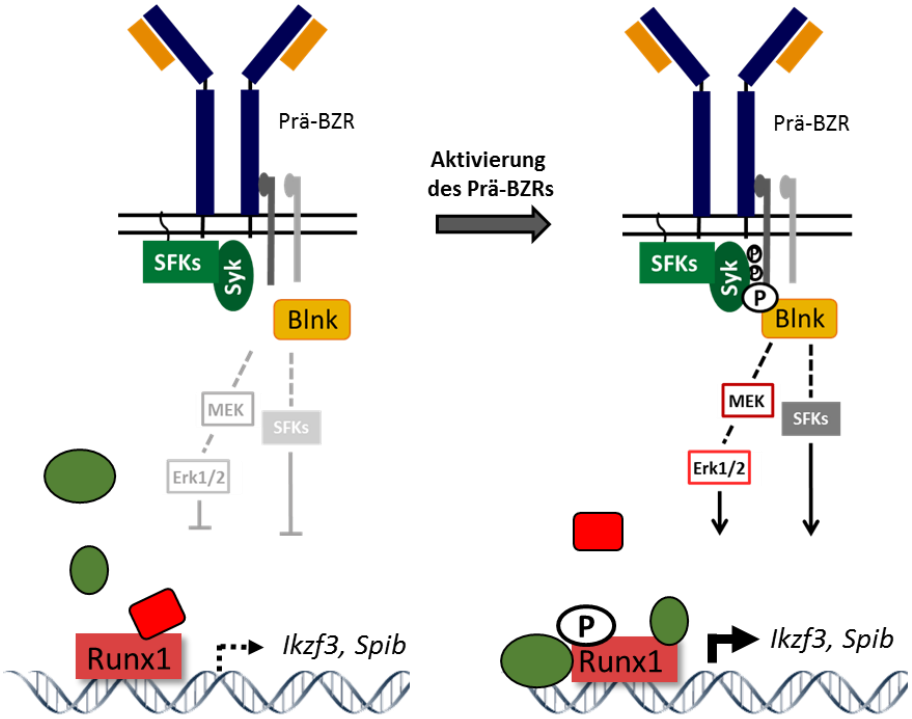


Abb. 30: Modell zur transkriptionellen Regulation von Runx1.
Nach Aktivierung der Blnk-abhängiger Signalwege stromabwärts des Prä-BZRs wird Runx1 an spezifischen Aminosäuresten phosphoryliert. Die durch MAPK oder Src-Kinasen vermittelte Phosphorylierung könnte die Dissoziation eines Ko-Repressors (rot) und/oder die Rekrutierung weiterer Ko-Aktivatoren (grün) bewirken. So ist die transkriptionelle Aktivität von Runx1 nach Induktion des Prä-BZRs deutlich erhöht, was in einer signifikant verstärkten Expression der differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktoren *Ikzf3* und *Spib* resultiert.

6.3 Runx1 beeinflusst die Differenzierung in Prä-B-Zellen durch ein Netzwerk an differenzierungsfördernden Interaktionen

Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse soll im Folgenden ein Modell zur Runx1-abhängigen Differenzierung der Prä-B-Zellpopulationen präsentiert werden. Am Prä-BZR-Kontrollpunkt aktiviert Runx1 die Transkription einer Reihe von Zielgenen, unter anderem Gene, die für Mitglieder der Lyn-Src-Kinasen kodieren. Darüber hinaus wird die transkriptionelle

Aktivität von Runx1 nach Induktion bestimmter Prä-BZR-abhängiger Signalwege durch Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein verstärkt. Diese Phosphorylierung könnte, wie bereits diskutiert, durch Mitglieder der Src-Kinase-Familie katalysiert werden. Die Lyn-Src-Kinasen steigern damit als direkte Zielgene von Runx1 in einem vorwärts gerichteten transkriptionellen Netzwerk spezifisch die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Diese verstärkte Runx1-Aktivität wiederum hat die Expression der differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktoren Aiolos und Spi-B zur Folge. Aufgrund der gezielten Aktivierung von *Spib* kann Runx1 im Anschluss durch Kooperation mit Spi-B die weitere Differenzierung durch Regulation stromabwärts gelegener gemeinsamer Zielgene fördern. Diese Wechselwirkung beider Transkriptionsfaktoren stellt damit ein weiteres „Feedforward" Motiv (Alon, 2007) dar, das die gezielte Differenzierung der Prä-B-Zellen stromabwärts des Prä-BZR-Kontrollpunkts vorantreibt (Abb. 31). Ein vergleichbares Zusammenwirken zweier Transkriptionsfaktoren ist dabei bereits für PU.1 und Runx1 in myeloiden Zellen beschrieben (Hoogenkamp et al., 2009) und könnte somit einen generellen Mechanismus für die Runx1-äbhängige Aktivierung von ETS-Faktoren und deren spätere Interaktion mit Runx1 zur Regulation nachgeschalteter Zielgene darstellen. Runx1 beeinflusst folglich als wichtiger Regulator verschiedener transkriptioneller Netzwerke am Prä-BZR-Kontrollpunkt die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen in unreife B-Zellen.

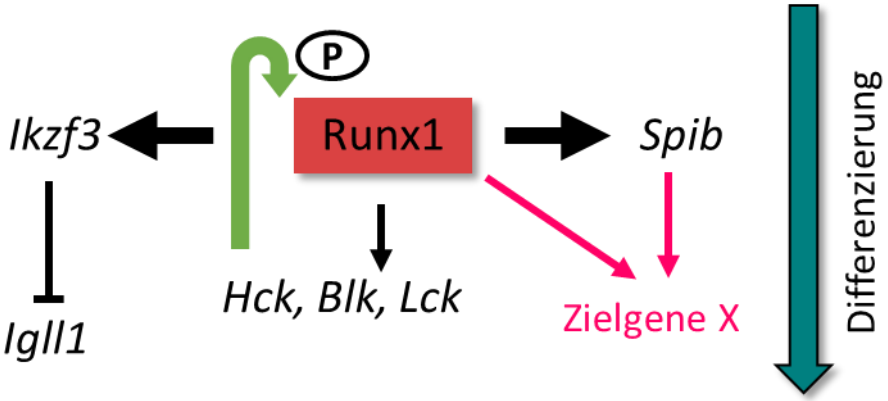


Abb. 31: Modell der wichtigsten Runx1-abhängigen Differenzierungsschritte im Prä-B-Zellstadium.
In Prä-B-Zellen aktiviert Runx1 die Expression der Lyn-Src-Kinasen Hck, Lck und Blk. Diese phosphorylieren wiederum Runx1, führen so in einem „Feedforward" Mechanismus zu einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors, die wiederum die Expression der differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktoren Aiolos (durch *Ikzf3* kodiert) und Spi-B zur Folge hat. Runx1 und Spi-B können darüber hinaus gemeinsam weitere Zielgene regulieren und so die Differenzierung der Prä-B-Zellen fördern.

Damit die Spi-B-abhängige Differenzierung der Prä-B-Zellen auch nach Beendigung der Prä-BZR-Signalgebung und damit ohne phosphoryliertes Runx1 gewährleistet werden kann, könnte Runx1 darüber hinaus in einem weiteren transkriptionellen Netzwerk mithilfe eines doppelpositiven „Feedback" Mechanismus (Alon, 2007) eine Runx1-unabhängige Expression von Spi-B induzieren. In diesem Netzwerk aktiviert Runx1 nach Stimulation des Prä-BZRs nicht nur die Expression von *Spib*, sondern beeinflusst auch die Expression eines zweiten Prä-B-zellspezifischen Transkriptionsfaktors, z.B. Irf-4. Im Anschluss induziert auch Irf-4 die Expression von Spi-B und umgekehrt, sodass durch diese

reziproke Regulation (doppelpositives „Feedback“) die Expression beider differenzierungsfördernder Transkriptionsfaktoren im weiteren Verlauf der Differenzierung unabhängig von der anfangs benötigten Runx1-Aktivität erfolgen kann. *Irf4* konnte dabei bereits als mögliches Runx1-Zielgen identifiziert werden (Niebuhr et al., 2013). Zudem sind bereits enge Kooperationen zwischen Irf-4 und Spi-B bekannt, die einen solchen Mechanismus unterstützen würden (Pang et al., 2014).

Für ein besseres Verständnis der transkriptionellen Regulation in Prä-B-Zellen wäre für zukünftige Arbeiten zudem wichtig, direkte Zielgene von Spi-B zum Beispiel mithilfe von ChIP-Analysen zu identifizieren, um die Interaktion mit Runx1, aber auch mit weiteren Prä-B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie Irf-4 zu verifizieren. Ein ChIP-Experiment mit endogenem Spi-B konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit aufgrund eines fehlenden Antikörpers nicht durchgeführt werden. Weiterhin war es nicht möglich, Spi-B als Fusionsprotein mit einem Flag-, Myc- oder HA-Tag zu exprimieren. Es wurden C- und N-terminal getaggte Fusionsproteine, verschiedene Plasmidkonstrukte sowie die Expression in einer Reihe von verschiedenen Zelllinien getestet. So konnte in Bezug auf potentielle Zielgene von Spi-B konnte bisher lediglich in *Spib/Sfpi1* defizienten Pro-B-Zellen gezeigt werden, dass die Transkription von Igλ, einem Isotyp der leichten Kette des BZR, reduziert und die weitere Differenzierung in späte Prä-B-Zellen blockiert ist (Schweitzer & DeKoter, 2004).

6.4 Die Rolle der Runx1-Zielgene bei der Entstehung einer t(12;21) assoziierten Prä-B-zellspezifischen Leukämie

Anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Runx1 ein bedeutender Regulator am Prä-BZR-Kontrollpunkt ist und die weitere Differenzierung durch Regulation komplexer transkriptioneller Netzwerke fördert. So ist die Aktivität von Runx1 für die Differenzierung der frühen Prä-B-Zellen essentiell. Folglich konnten in *Runx1*$^{\Delta/\Delta}$ Mäusen keine späten Prä-B-Zellen detektiert werden. Dieser Differenzierungsblock ist auch in Prä-B-zellspezifischen Leukämien zu finden, die die chromosomale Translokation t(12;21) aufweisen und daher das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 exprimieren. In Bezug auf die Funktion des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass eine dominant-negative Inhibierung der normalen Runx1-Zielgene stattfindet (Zelent et al., 2004). Übereinstimmend hiermit sind auch die in dieser Arbeit identifizierten Prä-B-zellspezifischen Runx1-Zielgene *IKZF3* und *SPIB* in ETV6/RUNX1 assoziierten Prä-B-ALLs signifikant herunter reguliert (Niebuhr et al., 2013). Die Expression der Gene stromabwärts der Prä-BZR-Signalgebung kann somit durch Bindung des Fusionsproteins nicht aktiviert und die weitere Runx1-abhängige Differenzierung der Vorläuferzellen nicht gefördert werden (Abb. 32). Zusätzlich wird die Expression anderer, bisher nicht regulierter Gene durch die spezifische Bindung des Fusionsproteins an die DNA beeinflusst und hierdurch unter anderem proliferationsfördernde

Signalwege in diesen Vorläuferzellen dereguliert (Linka et al., 2013). So ist die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung an diesem wichtigen Kontrollpunkt der frühen B-Zelldifferenzierung nicht mehr gewährleistet. In der Folge werden die Zellen in einen prä-leukämischen Zustand versetzt. Dies wiederum führt zur Akkumulation weiterer Mutationen, die letztlich die vollständige Transformation der Zelle bewirken (Greaves et al., 2003).

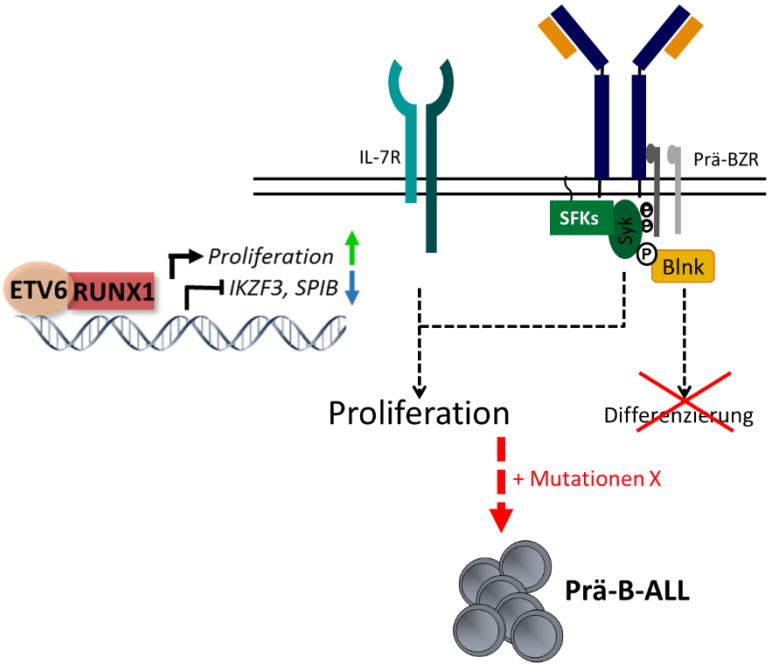


Abb. 32: Modell zur Leukämieentstehung in ETV6-RUNX1 exprimierenden Prä-B-Zellen.
Die Expression des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins bewirkt eine dominant-negative Inhibierung der differenzierungsfördernden Runx1-Zielgene und reguliert gleichzeitig eine Reihe neuer Zielgene, die die Proliferation der Vorläuferzellen begünstigen und die Zellen in einen prä-leukämischen Zustand versetzen. Durch die Anhäufung weiterer Mutationen erfolgt die vollständige Transformation in eine leukämische Zelle.

Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von Runx1 ein kritischer Faktor für die Aktivierung der Zielgene *Ikzf3* und *Spib* stromabwärts des Prä-BZRs ist. In Bezug auf die transkriptionelle Aktivität des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins könnte daher postuliert werden, dass aufgrund von spezifischen Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen im ETV6-RUNX1 Fusionsprotein die transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-RUNX1 alteriert und hierdurch die Regulation der RUNX1-Zielgene *IKZF3* und *SPIB* inhibiert ist. Dieses Modell bietet daher einen möglichen Mechanismus, wie die Inhibierung der RUNX1-Zielgene in ETV6-RUNX1 assoziierten Prä-B-ALL-Zellen beeinflusst werden könnte. Ein verändertes Muster an posttranslationalen Modifikationen, das spezifisch die Aktivität des Fusionsproteins beeinflusst, konnte dabei bereits für das RUNX1-ETO-Fusionsprotein identifiziert werden (Wang et al., 2011). Die Entwicklung kleiner Moleküle, die spezifisch die Fusionsprotein assoziierten Modifizierungen inhibieren, könnte demnach einen effektiven therapeutischen Ansatz darstellen, um diese besonders häufig im Kindesalter auftretende leukämische Erkrankung zu bekämpfen.

7 Literaturverzeichnis

Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y. & Jacobsen, S.E., 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. Immunity 15, 659-69.

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M. & Jacobsen, S.E., 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell 121, 295-306.

Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I.L., 1997. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. Cell 89, 1033-41.

Alon, U., 2007. Network motifs: theory and experimental approaches. Nat Rev Genet 8, 450-61.

Ardavin, C., 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol 3, 582-90.

Armstrong, S.A., Kung, A.L., Mabon, M.E., Silverman, L.B., Stam, R.W., Den Boer, M.L., Pieters, R., Kersey, J.H., Sallan, S.E., Fletcher, J.A., Golub, T.R., Griffin, J.D. & Korsmeyer, S.J., 2003. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. Cancer Cell 3, 173-83.

Armstrong, S.A., Mabon, M.E., Silverman, L.B., Li, A., Gribben, J.G., Fox, E.A., Sallan, S.E. & Korsmeyer, S.J., 2004. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 103, 3544-6.

Aziz-Aloya, R.B., Levanon, D., Karn, H., Kidron, D., Goldenberg, D., Lotem, J., Polak-Chaklon, S. & Groner, Y., 1998. Expression of AML1-d, a short human AML1 isoform, in embryonic stem cells suppresses in vivo tumor growth and differentiation. Cell Death Differ 5, 765-73.

Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. & Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res 37, W202-8.

Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M. & et al., 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. Cell 79, 885-92.

Bankovich, A.J., Raunser, S., Juo, Z.S., Walz, T., Davis, M.M. & Garcia, K.C., 2007. Structural insight into pre-B cell receptor function. Science 316, 291-4.

Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D. & Iscove, N.N., 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. Cell Stem Cell 6, 48-58.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. & Häcker, B., 2007. Biochemie, 6. Aufl. ed. Elsevier, München.

Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J. & Singh, H., 2005. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. Nat Immunol 6, 836-43.

Beyer, W.R., Westphal, M., Ostertag, W. & von Laer, D., 2002. Oncoretrovirus and Lentivirus Vectors Pseudotyped with Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein: Generation, Concentration, and Broad Host Range. Journal of Virology 76, 1488-1495.

Billot, K., Soeur, J., Chereau, F., Arrouss, I., Merle-Beral, H., Huang, M.E., Mazier, D., Baud, V. & Rebollo, A., 2011. Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. Blood 117, 1917-27.

Blyth, K., Cameron, E.R. & Neil, J.C., 2005. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. Nat Rev Cancer 5, 376-87.

Brady, G. & Farrell, P.J., 2009. RUNX3-mediated repression of RUNX1 in B cells. J Cell Physiol 221, 283-7.

Brass, A.L., Zhu, A.Q. & Singh, H., 1999. Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimers. EMBO J 18, 977-91.

Bulger, M. & Groudine, M., 2011. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. Cell 144, 327-39.

Cedar, H. & Bergman, Y., 2011. Epigenetics of haematopoietic cell development. Nat Rev Immunol 11, 478-88.

Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E. & Speck, N.A., 2009. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. Nature 457, 887-91.

Chiu, C.W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T. & Chan, A.C., 2002. BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. EMBO J 21, 6461-72.

Choukrallah, M.A. & Matthias, P., 2014. The Interplay between Chromatin and Transcription Factor Networks during B Cell Development: Who Pulls the Trigger First? Front Immunol 5, 156.

Chowdhury, D. & Sen, R., 2001. Stepwise activation of the immunoglobulin mu heavy chain gene locus. EMBO J 20, 6394-403.

Chuang, L.S., Ito, K. & Ito, Y., 2013. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. Int J Cancer 132, 1260-71.

Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H., 2014. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. Nat Rev Immunol 14, 69-80.

Coffer, P.J. & Burgering, B.M., 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. Nat Rev Immunol 4, 889-99.

Collins, A., Littman, D.R. & Taniuchi, I., 2009. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. Nat Rev Immunol 9, 106-15.

Corfe, S.A. & Paige, C.J., 2012. The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. Semin Immunol 24, 198-208.

Cumano, A. & Godin, I., 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. Annu Rev Immunol 25, 745-85.

Dahl, R., Ramirez-Bergeron, D.L., Rao, S. & Simon, M.C., 2002. Spi-B can functionally replace PU.1 in myeloid but not lymphoid development. EMBO J 21, 2220-30.

de Bruijn, M.F. & Speck, N.A., 2004. Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. Oncogene 23, 4238-48.

Deane, J.A. & Fruman, D.A., 2004. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. Annu Rev Immunol 22, 563-98.

Dekker, J., 2008. Gene regulation in the third dimension. Science 319, 1793-4.

DeKoter, R.P., Lee, H.J. & Singh, H., 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. Immunity 16, 297-309.

DeKoter, R.P. & Singh, H., 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. Science 288, 1439-41.

DeKoter, R.P., Walsh, J.C. & Singh, H., 1998. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. EMBO J 17, 4456-68.

Dengler, H.S., Baracho, G.V., Omori, S.A., Bruckner, S., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A. & Rickert, R.C., 2008. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. Nat Immunol 9, 1388-98.

Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A. & Vieira, P., 2005. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. J Exp Med 201, 971-9.

DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K., 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 377-81.

Farnham, P.J., 2009. Insights from genomic profiling of transcription factors. Nat Rev Genet 10, 605-16.

Ferreiros-Vidal, I., Carroll, T., Taylor, B., Terry, A., Liang, Z., Bruno, L., Dharmalingam, G., Khadayate, S., Cobb, B.S., Smale, S.T., Spivakov, M., Srivastava, P., Petretto, E., Fisher, A.G. & Merkenschlager, M., 2013. Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. Blood 121, 1769-82.

Frelin, C., Herrington, R., Janmohamed, S., Barbara, M., Tran, G., Paige, C.J., Benveniste, P., Zuniga-Pflucker, J.C., Souabni, A., Busslinger, M. & Iscove, N.N., 2013. GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. Nat Immunol 14, 1037-44.

Fuka, G., Kauer, M., Kofler, R., Haas, O.A. & Panzer-Grumayer, R., 2011. The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. PLoS One 6, e26348.

Fuxa, M. & Busslinger, M., 2007. Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. The Journal of Immunology 178, 8221-8221.

Garrett-Sinha, L.A., 2001. PU.1 exhibits partial functional redundancy with Spi-B, but not with Ets-1 or Elf-1. Blood 97, 2908-2912.

Garrett-Sinha, L.A., Su, G.H., Rao, S., Kabak, S., Hao, Z., Clark, M.R. & Simon, M.C., 1999. PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. Immunity 10, 399-408.

Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. & Schiff, C., 2002. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13014-9.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. & Sharpe, A., 1994. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. Cell 79, 143-56.

Ghozi, M.C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D. & Groner, Y., 1996. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1935-40.

Goetz, C.A., Harmon, I.R., O'Neil, J.J., Burchill, M.A. & Farrar, M.A., 2004. STAT5 activation underlies IL7 receptor-dependent B cell development. J Immunol 172, 4770-8.

Goyama, S., Huang, G., Kurokawa, M. & Mulloy, J.C., 2014. Posttranslational modifications of RUNX1 as potential anticancer targets. Oncogene 0.

Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L. & Ford, A.M., 2003. Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood 102, 2321-33.

Growney, J.D., Shigematsu, H., Li, Z., Lee, B.H., Adelsperger, J., Rowan, R., Curley, D.P., Kutok, J.L., Akashi, K., Williams, I.R., Speck, N.A. & Gilliland, D.G., 2005. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. Blood 106, 494-504.

Guo, H. & Friedman, A.D., 2011. Phosphorylation of RUNX1 by cyclin-dependent kinase reduces direct interaction with HDAC1 and HDAC3. J Biol Chem 286, 208-15.

Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J.A., Bailey, T.L. & Noble, W.S., 2007. Quantifying similarity between motifs. Genome Biol 8, R24.

Hagege, H., Klous, P., Braem, C., Splinter, E., Dekker, J., Cathala, G., de Laat, W. & Forne, T., 2007. Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). Nat Protoc 2, 1722-33.

Hamerschlak, N., 2008. Leukemia: genetics and prognostic factors. J Pediatr (Rio J) 84, S52-7.

Hardy, R.R., Kincade, P.W. & Dorshkind, K., 2007. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. Immunity 26, 703-14.

Hauser, J., Verma-Gaur, J. & Grundstrom, T., 2013. Broad feedback inhibition of pre-B-cell receptor signaling components. Mol Immunol 54, 247-53.

Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H. & Glass, C.K., 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. Mol Cell 38, 576-89.

Heizmann, B., Kastner, P. & Chan, S., 2013. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. J Exp Med 210, 2823-32.

Hendriks, R.W. & Kersseboom, R., 2006. Involvement of SLP-65 and Btk in tumor suppression and malignant transformation of pre-B cells. Semin Immunol 18, 67-76.

Heng, T.S., Painter, M.W. & Immunological Genome Project, C., 2008. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. Nat Immunol 9, 1091-4.

Herzog, S., Hug, E., Meixlsperger, S., Paik, J.H., DePinho, R.A., Reth, M. & Jumaa, H., 2008. SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K-PKB-Foxo pathway. Nat Immunol 9, 623-31.

Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. Nat Rev Immunol 9, 195-205.

Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., Pelanda, R. & Reth, M., 2006. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 13789-13794.

Hoelbl, A., Kovacic, B., Kerenyi, M.A., Simma, O., Warsch, W., Cui, Y., Beug, H., Hennighausen, L., Moriggl, R. & Sexl, V., 2006. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. Blood 107, 4898-906.

Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C. & Graves, B.J., 2007. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. Genes Dev 21, 1882-94.

Holmes, M.L., Carotta, S., Corcoran, L.M. & Nutt, S.L., 2006. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. Genes Dev 20, 933-8.

Hoogenkamp, M., Lichtinger, M., Krysinska, H., Lancrin, C., Clarke, D., Williamson, A., Mazzarella, L., Ingram, R., Jorgensen, H., Fisher, A., Tenen, D.G., Kouskoff, V., Lacaud, G. & Bonifer, C., 2009. Early chromatin unfolding by RUNX1: a molecular explanation for differential requirements during specification versus maintenance of the hematopoietic gene expression program. Blood 114, 299-309.

Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H.J., Yokomizo, T. & Ito, Y., 2001. Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. EMBO J 20, 723-33.

Huang, G., Zhang, P., Hirai, H., Elf, S., Yan, X., Chen, Z., Koschmieder, S., Okuno, Y., Dayaram, T., Growney, J.D., Shivdasani, R.A., Gilliland, D.G., Speck, N.A., Nimer, S.D. & Tenen, D.G., 2008. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. Nat Genet 40, 51-60.

Huang, H., Woo, A.J., Waldon, Z., Schindler, Y., Moran, T.B., Zhu, H.H., Feng, G.S., Steen, H. & Cantor, A.B., 2012. A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. Genes Dev 26, 1587-601.

Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M. & Hirai, H., 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med 10, 299-304.

Ichikawa, M., Goyama, S., Asai, T., Kawazu, M., Nakagawa, M., Takeshita, M., Chiba, S., Ogawa, S. & Kurokawa, M., 2008. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. J Immunol 180, 4402-8.

Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y. & Hirai, H., 2004. The Corepressor mSin3A Regulates Phosphorylation-Induced Activation, Intranuclear Location, and Stability of AML1. Molecular and Cellular Biology 24, 1033-1043.

Inlay, M.A., Bhattacharya, D., Sahoo, D., Serwold, T., Seita, J., Karsunky, H., Plevritis, S.K., Dill, D.L. & Weissman, I.L., 2009. Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. Genes Dev 23, 2376-81.

Ito, Y., 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. Genes Cells 4, 685-96.

Ito, Y., 2004. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. Oncogene 23, 4198-208.

Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., Fenyus, M.L., Elf, S., Chan, S., Kastner, P., Huettner, C.S., Murray, R., Tenen, D.G. & Akashi, K., 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. Blood 106, 1590-600.

John, L.B. & Ward, A.C., 2011. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. Mol Immunol 48, 1272-8.

Johnson, K., Chaumeil, J., Micsinai, M., Wang, J.M., Ramsey, L.B., Baracho, G.V., Rickert, R.C., Strino, F., Kluger, Y., Farrar, M.A. & Skok, J.A., 2012. IL-7 functionally segregates the pro-B cell stage by regulating transcription of recombination mediators across cell cycle. J Immunol 188, 6084-92.

Johnson, K., Hashimshony, T., Sawai, C.M., Pongubala, J.M., Skok, J.A., Aifantis, I. & Singh, H., 2008. Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. Immunity 28, 335-45.

Joshi, I., Yoshida, T., Jena, N., Qi, X., Zhang, J., Van Etten, R.A. & Georgopoulos, K., 2014. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. Nat Immunol 15, 294-304.

Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., Niemeyer, C.M. & Reth, M., 2003. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nature 423, 452-6.

Jumaa, H., Hendriks, R.W. & Reth, M., 2005. B cell signaling and tumorigenesis. Annu Rev Immunol 23, 415-45.

Karolchik, D., Hinrichs, A.S., Furey, T.S., Roskin, K.M., Sugnet, C.W., Haussler, D. & Kent, W.J., 2004. The UCSC Table Browser data retrieval tool. Nucleic Acids Res 32, D493-6.

Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. & Haussler, D., 2002. The human genome browser at UCSC. Genome Res 12, 996-1006.

Kikuchi, K., Kasai, H., Watanabe, A., Lai, A.Y. & Kondo, M., 2008. IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. J Immunol 181, 383-92.

Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. & Georgopoulos, K., 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. Immunity 10, 345-55.

Knoll, M., Yanagisawa, Y., Simmons, S., Engels, N., Wienands, J., Melchers, F. & Ohnishi, K., 2012. The non-Ig parts of the VpreB and lambda5 proteins of the surrogate light chain play opposite roles in the surface representation of the precursor B cell receptor. J Immunol 188, 6010-7.

Kondo, M., Akashi, K., Domen, J., Sugamura, K. & Weissman, I.L., 1997a. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice. Immunity 7, 155-62.

Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K., 1997b. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 91, 661-72.

Kriebitzsch, N., Masterarbeit 2011. Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Runx1 in der frühen B-Zell-Entwicklung, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Universität Hamburg.

Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S. & Busslinger, M., 2008. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. Immunity 28, 751-62.

Laiosa, C.V., Stadtfeld, M. & Graf, T., 2006. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. Annu Rev Immunol 24, 705-38.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10, R25.

Leddin, M., Perrod, C., Hoogenkamp, M., Ghani, S., Assi, S., Heinz, S., Wilson, N.K., Follows, G., Schonheit, J., Vockentanz, L., Mosammam, A.M., Chen, W., Tenen, D.G., Westhead, D.R., Gottgens, B., Bonifer, C. & Rosenbauer, F., 2011. Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. Blood 117, 2827-38.

Libermann, T.A., Pan, Z., Akbarali, Y., Hetherington, C.J., Boltax, J., Yergeau, D.A. & Zhang, D.E., 1999. AML1 (CBFalpha2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. J Biol Chem 274, 24671-6.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K., 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 712-20.

Lin, H. & Grosschedl, R., 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. Nature 376, 263-7.

Lin, Y.C., Benner, C., Mansson, R., Heinz, S., Miyazaki, K., Miyazaki, M., Chandra, V., Bossen, C., Glass, C.K. & Murre, C., 2012. Global changes in the nuclear positioning of genes and intra- and interdomain genomic interactions that orchestrate B cell fate. Nat Immunol 13, 1196-204.

Lin, Y.C., Jhunjhunwala, S., Benner, C., Heinz, S., Welinder, E., Mansson, R., Sigvardsson, M., Hagman, J., Espinoza, C.A., Dutkowski, J., Ideker, T., Glass, C.K. & Murre, C., 2010. A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. Nat Immunol 11, 635-43.

Linka, Y., Ginzel, S., Kruger, M., Novosel, A., Gombert, M., Kremmer, E., Harbott, J., Thiele, R., Borkhardt, A. & Landgraf, P., 2013. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in

precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. Blood Cancer J 3, e151.

Lorsbach, R.B., Moore, J., Ang, S.O., Sun, W., Lenny, N. & Downing, J.R., 2004. Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. Blood 103, 2522-9.

Lowell, C.A., Soriano, P. & Varmus, H.E., 1994. Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. Genes Dev 8, 387-98.

Lu, R., Medina, K.L., Lancki, D.W. & Singh, H., 2003. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. Genes Dev 17, 1703-8.

Luc, S., Buza-Vidas, N. & Jacobsen, S.E., 2008. Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment. Semin Immunol 20, 213-20.

Ma, S., Pathak, S., Mandal, M., Trinh, L., Clark, M.R. & Lu, R., 2010. Ikaros and Aiolos inhibit pre-B-cell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. Mol Cell Biol 30, 4149-58.

Ma, S., Pathak, S., Trinh, L. & Lu, R., 2008. Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. Blood 111, 1396-403.

Machanick, P. & Bailey, T.L., 2011. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. Bioinformatics 27, 1696-7.

Mackarehtschian, K., Hardin, J.D., Moore, K.A., Boast, S., Goff, S.P. & Lemischka, I.R., 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity 3, 147-61.

Maier, H., Ostraat, R., Gao, H., Fields, S., Shinton, S.A., Medina, K.L., Ikawa, T., Murre, C., Singh, H., Hardy, R.R. & Hagman, J., 2004. Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. Nat Immunol 5, 1069-77.

Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasser, A. & Busslinger, M., 2010. Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. Nat Immunol 11, 171-9.

Mandal, M., Powers, S.E., Ochiai, K., Georgopoulos, K., Kee, B.L., Singh, H. & Clark, M.R., 2009. Ras orchestrates exit from the cell cycle and light-chain recombination during early B cell development. Nat Immunol 10, 1110-7.

Manning, B.D. & Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 129, 1261-74.

Mansson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thoren, L., Adolfsson, J., Buza-Vidas, N., Qian, H., Soneji, S., Enver, T., Sigvardsson, M. & Jacobsen, S.E., 2007. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. Immunity 26, 407-19.

Mansson, R., Welinder, E., Ahsberg, J., Lin, Y.C., Benner, C., Glass, C.K., Lucas, J.S., Sigvardsson, M. & Murre, C., 2012. Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 21028-33.

Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. & Akashi, K., 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood 97, 3333-41.

Masson, K. & Ronnstrand, L., 2009. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. Cell Signal 21, 1717-26.

Matsumura, I., Mizuki, M. & Kanakura, Y., 2008. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. Cancer Sci 99, 479-85.

Matthias, P. & Rolink, A.G., 2005. Transcriptional networks in developing and mature B cells. Nat Rev Immunol 5, 497-508.

McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E.R., Teepe, M., Lyman, S.D. & Peschon, J.J., 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood 95, 3489-97.

McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. & Maki, R.A., 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. EMBO J 15, 5647-58.

Medina, K.L., Pongubala, J.M., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R. & Singh, H., 2004. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. Dev Cell 7, 607-17.

Meixlsperger, S., Kohler, F., Wossning, T., Reppel, M., Muschen, M. & Jumaa, H., 2007. Conventional light chains inhibit the autonomous signaling capacity of the B cell receptor. Immunity 26, 323-33.

Melchers, F., ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X.C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A.G. & Andersson, J., 2000. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. Immunol Rev 175, 33-46.

Mellman, I. & Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 106, 255-8.

Melnikova, I.N., Crute, B.E., Wang, S. & Speck, N.A., 1993. Sequence specificity of the core-binding factor. J Virol 67, 2408-11.

Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M. & Busslinger, M., 2002. Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. Science 297, 110-3.

Miller, J.P., Izon, D., DeMuth, W., Gerstein, R., Bhandoola, A. & Allman, D., 2002. The Earliest Step in B Lineage Differentiation from Common Lymphoid Progenitors Is Critically Dependent upon Interleukin 7. Journal of Experimental Medicine 196, 705-711.

Miyoshi, H., Ohira, M., Shimizu, K., Mitani, K., Hirai, H., Imai, T., Yokoyama, K., Soeda, E. & Ohki, M., 1995. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. Nucleic Acids Res 23, 2762-9.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V.E., 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68, 869-77.

Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T., 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. Gene Ther 7, 1063-6.

Morrison, S.J. & Scadden, D.T., 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature 505, 327-34.

Morrison, S.J. & Weissman, I.L., 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity 1, 661-73.

Mourcin, F., Breton, C., Tellier, J., Narang, P., Chasson, L., Jorquera, A., Coles, M., Schiff, C. & Mancini, S.J., 2011. Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. Blood 117, 6552-61.

Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., Su, X., Pui, C.H., Relling, M.V., Evans, W.E., Shurtleff, S.A. & Downing, J.R., 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 446, 758-64.

Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C.A., Seidler, L. & Ehrenstein, M., 2009. Janeway immunologie, 7. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.

Nechanitzky, R., Akbas, D., Scherer, S., Gyory, I., Hoyler, T., Ramamoorthy, S., Diefenbach, A. & Grosschedl, R., 2013. Transcription factor EBF1 is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. Nat Immunol 14, 867-75.

Ng, S.Y., Yoshida, T., Zhang, J. & Georgopoulos, K., 2009. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. Immunity 30, 493-507.

Niebuhr, B., Fischer, M., Tager, M., Cammenga, J. & Stocking, C., 2008. Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia. Blood Cells Mol Dis 40, 211-8.

Niebuhr, B., Kriebitzsch, N., Fischer, M., Behrens, K., Gunther, T., Alawi, M., Bergholz, U., Muller, U., Roscher, S., Ziegler, M., Buchholz, F., Grundhoff, A. & Stocking, C., 2013. Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development. Blood 122, 413-23.

Nishizumi, H., Taniuchi, I., Yamanashi, Y., Kitamura, D., Ilic, D., Mori, S., Watanabe, T. & Yamamoto, T., 1995. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. Immunity 3, 549-60.

Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X. & Leonard, W.J., 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. Science 262, 1877-80.

Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G. & Busslinger, M., 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. Nature 401, 556-62.

Nutt, S.L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M. & Wu, L., 2005. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. J Exp Med 201, 221-31.

Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Mandal, M., Triggs, J.R., Bertolino, E., Sciammas, R., Dinner, A.R., Clark, M.R. & Singh, H., 2012. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. Nat Immunol 13, 300-7.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. & Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. Science 248, 1517-23.

Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K. & Ito, Y., 1993. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 6859-63.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G. & Downing, J.R., 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell 84, 321-30.

Palmer, M.J., Mahajan, V.S., Trajman, L.C., Irvine, D.J., Lauffenburger, D.A. & Chen, J., 2008. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. Cell Mol Immunol 5, 79-89.

Panaroni, C. & Wu, J.Y., 2013. Interactions between B lymphocytes and the osteoblast lineage in bone marrow. Calcif Tissue Int 93, 261-8.

Pang, S.H., Carotta, S. & Nutt, S.L., 2014. Transcriptional control of pre-B cell development and leukemia prevention. Curr Top Microbiol Immunol 381, 189-213.

Park, L.S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J.P., Muller, W., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Farr, A.G., Ziegler, S.F., Morrissey, P.J., Paxton, R. & Sims, J.E., 2000. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. J Exp Med 192, 659-70.

Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. & Weissman, I.L., 2003. 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.

Pencovich, N., Jaschek, R., Dicken, J., Amit, A., Lotem, J., Tanay, A. & Groner, Y., 2013. Cell-autonomous function of Runx1 transcriptionally regulates mouse megakaryocytic maturation. PLoS One 8, e64248.

Pencovich, N., Jaschek, R., Tanay, A. & Groner, Y., 2011. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. Blood 117, e1-14.

Perry, C., Eldor, A. & Soreq, H., 2002. Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. Leuk Res 26, 221-8.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., Meyer, J.D. & Davison, B.L., 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. J Exp Med 180, 1955-60.

Peterson, L.F. & Zhang, D.E., 2004. The 8;21 translocation in leukemogenesis. Oncogene 23, 4255-62.

Polli, M., Dakic, A., Light, A., Wu, L., Tarlinton, D.M. & Nutt, S.L., 2005. The development of functional B lymphocytes in conditional PU.1 knock-out mice. Blood 106, 2083-90.

Pozner, A., Lotem, J., Xiao, C., Goldenberg, D., Brenner, O., Negreanu, V., Levanon, D. & Groner, Y., 2007. Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis. BMC Dev Biol 7, 84.

Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K. & Nutt, S.L., 2008. Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. J Immunol 180, 1719-28.

Putz, G., Rosner, A., Nuesslein, I., Schmitz, N. & Buchholz, F., 2006. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. Oncogene 25, 929-39.

Rao, S., Matsumura, A., Yoon, J. & Simon, M.C., 1999. SPI-B activates transcription via a unique proline, serine, and threonine domain and exhibits DNA binding affinity differences from PU.1. J Biol Chem 274, 11115-24.

Ray, D., Bosselut, R., Ghysdael, J., Mattei, M.G., Tavitian, A. & Moreau-Gachelin, F., 1992. Characterization of Spi-B, a transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1. Mol Cell Biol 12, 4297-304.

Rennert, J., Coffman, J.A., Mushegian, A.R. & Robertson, A.J., 2003. The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. BMC Evol Biol 3, 4.

Revilla, I.D.R., Bilic, I., Vilagos, B., Tagoh, H., Ebert, A., Tamir, I.M., Smeenk, L., Trupke, J., Sommer, A., Jaritz, M. & Busslinger, M., 2012. The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. EMBO J 31, 3130-46.

Reynaud, D., Demarco, I.A., Reddy, K.L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S.T., Winandy, S. & Singh, H., 2008. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. Nat Immunol 9, 927-36.

Rickert, R.C., 2013. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. Nat Rev Immunol 13, 578-91.

Roessler, S., Gyory, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M., Fisher, A.G. & Grosschedl, R., 2007. Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. Mol Cell Biol 27, 579-94.

Rolink, A.G., Nutt, S.L., Melchers, F. & Busslinger, M., 1999. Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. Nature 401, 603-6.

Rowley, R.B., Burkhardt, A.L., Chao, H.G., Matsueda, G.R. & Bolen, J.B., 1995. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. J Biol Chem 270, 11590-4.

Saijo, K., Schmedt, C., Su, I.H., Karasuyama, H., Lowell, C.A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A. & Tarakhovsky, A., 2003. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. Nat Immunol 4, 274-9.

Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A.L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J.B. & Nussenzweig, M., 1993. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. J Exp Med 178, 1049-55.

Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A. & Busslinger, M., 2007. Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. Immunity 27, 49-63.

Schweitzer, B.L. & DeKoter, R.P., 2004. Analysis of gene expression and Ig transcription in PU.1/Spi-B-deficient progenitor B cell lines. J Immunol 172, 144-54.

Schwickert, T.A., Tagoh, H., Gultekin, S., Dakic, A., Axelsson, E., Minnich, M., Ebert, A., Werner, B., Roth, M., Cimmino, L., Dickins, R.A., Zuber, J., Jaritz, M. & Busslinger, M., 2014. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. Nat Immunol 15, 283-93.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. & Singh, H., 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. Science 265, 1573-7.

Seet, C.S., Brumbaugh, R.L. & Kee, B.L., 2004. Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. J Exp Med 199, 1689-700.

Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., Schrappe, M., Biondi, A., Basso, G., Bercovich, D., Muckenthaler, M.U. & Izraeli, S., 2011. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. J Exp Med 208, 901-8.

Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J. & Jacobsen, S.E., 2002. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Immunity 17, 463-72.

Small, D., 2006. FLT3 mutations: biology and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 178-84.

Sokalski, K.M., Li, S.K., Welch, I., Cadieux-Pitre, H.A., Gruca, M.R. & DeKoter, R.P., 2011. Deletion of genes encoding PU.1 and Spi-B in B cells impairs differentiation and induces pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 118, 2801-8.

Speck, N.A. & Gilliland, D.G., 2002. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. Nat Rev Cancer 2, 502-13.

Spitz, F. & Furlong, E.E., 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. Nat Rev Genet 13, 613-26.

Su, G.H., Chen, H.M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L.A., Baunoch, D., Tenen, D.G. & Simon, M.C., 1997. Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. EMBO J 16, 7118-29.

Su, Y.W., Flemming, A., Wossning, T., Hobeika, E., Reth, M. & Jumaa, H., 2003. Identification of a pre-BCR lacking surrogate light chain. J Exp Med 198, 1699-706.

Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H. & Nishikawa, S., 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 9125-9.

Tanaka, T., Kurokawa, M., Ueki, K., Tanaka, K., Imai, Y., Mitani, K., Okazaki, K., Sagata, N., Yazaki, Y., Shibata, Y., Kadowaki, T. & Hirai, H., 1996. 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.

Texido, G., Su, I.H., Mecklenbrauker, I., Saijo, K., Malek, S.N., Desiderio, S., Rajewsky, K. & Tarakhovsky, A., 2000. The B-cell-specific Src-family kinase Blk is dispensable for B-cell development and activation. Mol Cell Biol 20, 1227-33.

Thompson, E.C., Cobb, B.S., Sabbattini, P., Meixlsperger, S., Parelho, V., Liberg, D., Taylor, B., Dillon, N., Georgopoulos, K., Jumaa, H., Smale, S.T., Fisher, A.G. & Merkenschlager, M., 2007. Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits. Immunity 26, 335-44.

Tretter, T., Ross, A.E., Dordai, D.I. & Desiderio, S., 2003. Mimicry of pre-B cell receptor signaling by activation of the tyrosine kinase Blk. J Exp Med 198, 1863-73.

Tsapogas, P., Zandi, S., Ahsberg, J., Zetterblad, J., Welinder, E., Jonsson, J.I., Mansson, R., Qian, H. & Sigvardsson, M., 2011. IL-7 mediates Ebf-1-dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. Blood 118, 1283-90.

Vilagos, B., Hoffmann, M., Souabni, A., Sun, Q., Werner, B., Medvedovic, J., Bilic, I., Minnich, M., Axelsson, E., Jaritz, M. & Busslinger, M., 2012. Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types. J Exp Med 209, 775-92.

von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E. & Murray, R., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. J Exp Med 181, 1519-26.

Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M. & Georgopoulos, K., 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. Immunity 5, 537-49.

Wang, L., Gural, A., Sun, X.J., Zhao, X., Perna, F., Huang, G., Hatlen, M.A., Vu, L., Liu, F., Xu, H., Asai, T., Xu, H., Deblasio, T., Menendez, S., Voza, F., Jiang, Y., Cole, P.A., Zhang, J., Melnick, A., Roeder, R.G. & Nimer, S.D., 2011. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. Science 333, 765-9.

Wee, H.J., Voon, D.C., Bae, S.C. & Ito, Y., 2008. PEBP2-beta/CBF-beta-dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. Blood 112, 3777-87.

Weissman, I.L., 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 100, 157-68.

Welinder, E., Mansson, R., Mercer, E.M., Bryder, D., Sigvardsson, M. & Murre, C., 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 17402-7.

Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J., 2000. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. Cell Mol Life Sci 57, 1172-83.

Wilson, N.K., Foster, S.D., Wang, X., Knezevic, K., Schutte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P.M., Kinston, S., Ouwehand, W.H., Dzierzak, E., Pimanda, J.E., de Bruijn, M.F. & Gottgens, B., 2010.

Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. Cell Stem Cell 7, 532-44.

Xu, L.S., Sokalski, K.M., Hotke, K., Christie, D.A., Zarnett, O., Piskorz, J., Thillainadesan, G., Torchia, J. & DeKoter, R.P., 2012. Regulation of B cell linker protein transcription by PU.1 and Spi-B in murine B cell acute lymphoblastic leukemia. J Immunol 189, 3347-54.

Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., Hennighausen, L. & O'Shea, J.J., 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 1000-5.

Ye, M., Ermakova, O. & Graf, T., 2005. PU.1 is not strictly required for B cell development and its absence induces a B-2 to B-1 cell switch. J Exp Med 202, 1411-22.

Yoshida, T., Ng, S.Y., Zuniga-Pflucker, J.C. & Georgopoulos, K., 2006. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. Nat Immunol 7, 382-91.

Zandi, S., Mansson, R., Tsapogas, P., Zetterblad, J., Bryder, D. & Sigvardsson, M., 2008. EBF1 Is Essential for B-Lineage Priming and Establishment of a Transcription Factor Network in Common Lymphoid Progenitors. The Journal of Immunology 181, 3364-3372.

Zelent, A., Greaves, M. & Enver, T., 2004. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Oncogene 23, 4275-83.

Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., Sarmento, L.M., Correia, N., Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R., Brandalise, S.R., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum, S.K., Yunes, J.A. & Barata, J.T., 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 43, 932-9.

Zhang, Y., Biggs, J.R. & Kraft, A.S., 2004. Phorbol ester treatment of K562 cells regulates the transcriptional activity of AML1c through phosphorylation. J Biol Chem 279, 53116-25.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W. & Liu, X.S., 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). Genome Biol 9, R137.

Ziegler, S.E., Morella, K.K., Anderson, D., Kumaki, N., Leonard, W.J., Cosman, D. & Baumann, H., 1995. Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. Eur J Immunol 25, 399-404.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. & Trono, D., 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol 72, 9873-80.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1: Primärantikörper für Westernblot-Analysen. ... 35

Tab. 2: Sekundärantikörper für Westernblot-Analysen. ... 35

Tab. 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie. ... 35

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Primer für die quantitative Realtime-PCR. ... 37

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer für die Genotyp-PCR. ... 37

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Kontroll-Primer in der 3C-Analyse. ... 37

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primer in der 3C-Analyse. ... 38

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Sonden bei der 3C-Analyse. ... 39

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung der RUNX1- Phosphorylierungsmutanten. ... 39

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1: Schematische Darstellung der adulten Hämatopoese. ... 5

Abb. 2: Übersicht über die frühe B-Zelldifferenzierung und die Expression spezifischer Oberflächenmarker. ... 7

Abb. 3 Schematische Darstellung von FLT3. ... 8

Abb. 4: Übersicht über die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors. ... 9

Abb. 5: Struktur des IL-7-Rezeptors. ... 10

Abb. 6: Signaltransduktion stromabwärts vom IL-7-Rezeptor. ... 12

Abb. 7: Struktur des Prä-B- und des B-Zellrezeptors. ... 13

Abb. 8: Übersicht über die Rekombinationsschritte des Immunglobulinlocus während der frühen B-Zellentwicklung. ... 14

Abb. 9: Übersicht über die Signaltransduktion durch den Prä-BZR. ... 17

Abb. 10: Zusammenspiel der Interleukin-7- und Prä-B-Zellrezeptor-Signaltransduktion in frühen Prä-B-Zellen. ... 18

Abb. 11: Übersicht über die wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der frühen B-Zelldifferenzierung. ... 25

Abb. 12: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Runx1 und interagierende Kofaktoren. ... 27

Abb. 13: Domänenstruktur der Fusionsproteine RUNX1-ETO sowie ETV6-RUNX1. ... 28

Abb. 14: Die Deletion von Runx1 in späten CLPs führt zu einem Block der Differenzierung in der Prä-B-Zellpopulation. ... 56

Abb. 15: Wichtige Zielgene von Runx1 werden in der frühen B-Zellentwicklung differentiell exprimiert. 58

Abb. 16: Das RUNX1-ERt2-Fusionsprotein transloziert nach 4-OHT-Zugabe in den Zellkern. . 59

Abb. 17: Genomweite Analyse der Runx1-Bindungsstellen in einer Pro-B-Zelllinie mit induzierbarer RUNX1-Überexpression. 61

Abb. 18: Detaillierte Betrachtung der Runx1-Bindungsstellen in den genomischen Loci ausgewählter Runx1-Zielgene. 63

Abb. 19: Interaktionen von Promotor- und *Enhancer*-Elementen können mithilfe der 3C-Analyse untersucht werden. 65

Abb. 20: Die Bindung von Runx1 unterstützt Konformationsänderungen in der DNA, die die Transkription spezifischer Gene aktiv beeinflussen können. 67

Abb. 21: Die Aktivierung des BLNK-abhängigen Prä-B-Zellrezeptorsignalwegs verstärkt die Expression der Runx1-Zielgene *Ikzf3* und *Spib*. 69

Abb. 22: Etablierung einer induzierbaren Pro-B-Zelllinie aus *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen. 71

Abb. 23: Die Aktivierung des Prä-B-Zellrezeptors in transduzierten *Rag1*$^{-/-}$ Pro-B-Zellen führt zur verstärkten Expression von Ikzf3 und Spib auf mRNA-Ebene. 73

Abb. 24: Runx1 wird stromabwärts der Prä-B-Zellrezeptorsignaltransduktion verstärkt phosphoryliert. 75

Abb. 25: Etablierung von RUNX1-Phosphorylierungsmutanten. 78

Abb. 26: Die Aktivierung der *Ikzf3*- und *Spib*-Expression ist von der Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste im Runx1-Protein abhängig. 81

Abb. 27: Die transkriptionelle Aktivität von Runx1 kann durch Kinase-Inhibitoren verringert werden. 84

Abb. 28: Die transkriptionelle Aktivierung von Runx1 in Abhängigkeit vom MAPK-Signalweg. 94

Abb. 29: Die transkriptionelle Aktivierung von Runx1 in Abhängigkeit von Src-Kinasen. 95

Abb. 30: Modell zur transkriptionellen Regulation von Runx1. 96

Abb. 31: Modell der wichtigsten Runx1-abhängigen Differenzierungsschritte im Prä-B-Zellstadium. 97

Abb. 32: Modell zur Leukämieentstehung in ETV6-RUNX1 exprimierenden Prä-B-Zellen. 99

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphoide Leukämie
AML	akute myeloide Leukämie
B6	C57BL/6
Bp	Basenpaar
BSA	*bovine serum albumine*
BZR	B-Zellrezeptor
CBF	*core-binding-factor*
CD	*cluster of differentiation*
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CLP	allgemeiner lymphoider Vorläufer (*common lymphoid progenitor*)
CMP	allgemeiner myeloider Vorläufer (*common myeloid progenitor*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Env	Gen für retrovirale Hüllproteine
EtOH	Ethanol
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FLT3	*FMS-like tyrosine kinase 3*
g	Gramm
Gag	Gen fur retrovirale Kapsidproteine
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

GMP	Granulozyten-Monozyten-Progenitor
H3K4	Lysin 4 des Histons 3
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ITD	interne Tandemduplikation
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
LT-HSZ	*Long Term*-HSZ
me2	Dimethylierung
me3	Trimethylierung
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
min	Minuten
MoMLV	*Moloney murine leukemia virus*
MPP	Multipotenter Progenitor
NLS	Kernlokalisationssignal
NMS	nukleäres Matrixsignal
P	Phosphorylierung
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
Pol	Gen für retrovirale Polymerase-Enzyme
PTM	Posttranslationale Modifikation
q*RT*-PCR	quantitative Echtzeit (*real time*)-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (*Ribonucleic acid*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*)
SLC	*surrogate light chain*
ST-HSZ	*Short Term*-HSZ
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	Fallbeschleunigung

9.2 Summary

Early B-cell development is characterized by stepwise rearrangements of the immunoglobulin gene loci which are important for the diversified heavy and light chains that form the antigen-specific B-cell receptor (BCR). Productive rearrangements are controlled at different checkpoints during B-cell differentiation. During the first checkpoint a pre-BCR, which is composed of the rearranged heavy chain and a surrogate light chain, is transiently expressed on the cell surface of early pre-B-cells. Signaling of the pre-BCR is responsible for proliferation and subsequent differentiation of these progenitor cells. Disruption of this checkpoint contributes to malignant transformation and to the development of a pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia (pre-B-ALL). A common recurrent event in pre-B-ALL is the chromosomal translocation t(12;21), leading to the expression of the ETV6-RUNX1 fusion protein. It has been postulated that the fusion protein inhibits normal RUNX1 target genes. Runx1 is one of the key transcription factors during hematopoiesis and is involved in many processes that control myeloid and lymphoid development. Importantly, conditional *Runx1* knockout mice exhibit a defect in differentiation of early B-cell progenitors. However, little is known about the function of Runx1 and its target genes in the early B-cell populations, especially during the pre-BCR checkpoint.

Therefore, the goal of this study was to better understand the Runx1-dependent transcriptional regulation in early B-cell progenitors. In this work, the block in B-cell differentiation in *Runx1*-deficient mice was localized downstream of the pre-BCR checkpoint at the transition to the late pre-B-cell stage. Furthermore, two groups of Runx1-target genes could be identified, which have previously been implicated in signaling pathways downstream of the IL-7-receptor and the pre-BCR in early pre-B-cells and therefore likely contribute to the observed B-cell block in *Runx1*-deficient mice. These include genes which encode (1) members of the Lyn-Src kinase family e.g. Hck and Blk and (2) the transcription factors Aiolos and Spi-B. Genome-wide analysis of Runx1-DNA-binding sites confirmed direct binding to the identified target genes, which was characterized by a preferential binding to distal enhancer elements. Moreover, for the Aiolos-encoding *Ikzf3* locus it could be shown that DNA looping between the Runx1-bound enhancer element and a proximal sequence of the promoter element occurred. This reveals one possible mechanism how binding of Runx1 to defined enhancer elements can directly influence the specific expression of Runx1-target genes.

The activation of cell type-specific target genes is essential for the differentiation of progenitor cells and regulated by complex transcriptional networks. By analyzing the consequences of pre-BCR signaling on Runx1-target gene activation and on Runx1 phosphorylation, several Runx1-regulated transcriptional networks were identified in this study. These are composed of “feedforward” motifs and therefore likely support the differentiation of pre-B-cell progenitors downstream of pre-BCR

signaling. In the first feedforward loop, Runx1 induces the expression of Lyn-Src-kinases. These kinases, in turn, reinforce Runx1 phosphorylation after activation of pre-BCR signaling, leading to an enhanced transcriptional activity of Runx1. Consequently, Runx1 can activate the expression of specific downstream target genes that promote further differentiation (e.g. *Spib* and *Ikzf3*). Based on the co-localization of Runx1 and Spi-B DNA binding motifs that were identified during this work, a second feedforward loop was postulated. In this regulatory network, Runx1 induces the expression of *Spib* in cooperation with B-cell specific transcription factors such as E2A and Pax5. After activation of *Spib*, Runx1 and Spi-B jointly regulate further pre-B-cell specific downstream targets driving differentiation to the immature B-cell stage.

In summary, this work has revealed that Runx1 is a lynchpin in transcriptional networks that govern the pre-BCR checkpoint and is essential for further differentiation of early pre-B-cells. Loss of Runx1 function in ETV6-RUNX1 expressing cells leads to disruption of these transcriptional networks. As a consequence, differentiation promoting genes like *IKZF3* and *SPIB* are not activated downstream of pre-BCR signaling. Therefore, the balance between differentiation and proliferation at the pre-BCR checkpoint is no longer ensured, leading to the development of a pre-leukemic phenotype. These new insights into Runx1-dependent transcriptional regulation at the pre-BCR checkpoint may help to define relevant pharmaceutical targets for reversing the disruptive action of the ETV6-RUNX1 fusion protein.

Danksagung

Mein größtes Dankeschön gilt Frau Dr. Carol Stocking, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für Deine unermüdliche Unterstützung und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Zeit am HPI.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner möchte ich mich ebenfalls herzlich für die Betreuung während der letzten drei Jahre bedanken und dass er sich sogleich als Zweitgutachter meiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an das gesamte Team der Retroviralen Pathogenese. Vielen Dank für Eure Unterstützung, nicht nur in Bezug auf wissenschaftliche Fragestellungen! Die besondere Atmosphäre in dieser Arbeitsgruppe hat mich immer gern zur Arbeit fahren lassen und mich gerade in den letzten Wochen immer wieder motiviert.

Auch den Kolleginnen und Kollegen der Tierhaltung möchte ich ganz herzlich für die immer hilfsbereite Unterstützung danken.

Arne Düsedau danke ich für die oftmals benötigte Expertise bei durchflusszytometrischen Analysen. Weiterhin danke ich Daniela Indenbirken und Malik Alawi für die Hilfe bei der Generierung und Auswertung der NGS-Datensätze.

Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich auch an meine Freunde und an meine Familie, die mir während des Studiums und der Promotion immer mit Rat und Unterstützung beiseite standen und mich gerade während der letzten Wochen immer wieder aufgemuntert haben. Besonders meinen Eltern möchte ich danken, dass sie mir ermöglicht haben, ohne Sorgen studieren zu können und mir in den letzten Jahren zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr geschenkt haben. Ich danke Euch sehr!

Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, im November 2014

_____

(Neele-Margarete Kriebitzsch)