

# DIE REGULATION VON *FUBP1* DURCH TAL1 WÄHREND DER ERYTHROPOESE

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

M.Sc. Mbalia Jasmin Yillah

aus Frankfurt am Main

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referent: Prof. Dr. Alexander Löwer

Tag der Einreichung: 12. Januar 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2017

Darmstadt 2017

D 17

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Hämatopoese .....	3
2.1.1 Hämatopoetische Stammzellen .....	3
2.1.2 Embryonale Hämatopoese .....	4
2.1.3 Adulte Hämatopoese .....	5
2.1.4 Hämatopoetische Entwicklungslinien.....	6
2.1.5 Erythropoese.....	7
2.1.6 Megakaryopoese.....	8
2.1.7 Zytokine .....	10
2.1.8 Oberflächenmarker.....	12
2.1.9 Transkriptionelle Regulation der Hämatopoese .....	13
2.1.10 Signalwege in der Hämatopoese.....	15
2.2 Das <i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i> .....	16
2.2.1 Struktur und <i>basic-helix-loop-helix</i> -Motiv von TAL1 .....	17
2.2.2 TAL1-Interaktionspartner.....	18
2.2.3 TAL1 in der Hämatopoese.....	20
2.2.4 TAL1 in der akuten lymphatischen T-Zelleukämie .....	20
2.2.5 Zielgene von TAL1 .....	22
2.3 Das <i>Fuse binding protein 1</i> .....	24
2.3.1 Struktur von FUBP1 .....	24
2.3.2 <i>FUSE binding protein</i> Familie .....	24
2.3.3 FUBP1 als RNA bindendes Protein .....	25
2.3.4 Einfluss von FUBP1 auf zelluläre Prozesse und Karzinogenese .....	26
2.3.5 FUBP1 als transkriptioneller Regulator von <i>MYC</i> .....	27
2.3.6 Das FUBP1-Zielgen <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> .....	29

---

2.4	Zielsetzung .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Die Regulation von <i>FUBP1</i> durch <i>TAL1</i> .....	32
3.1.1	<i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> werden in verschiedenen Zelllinien und hämatopoetischen Progenitorzellen ko-exprimiert .....	32
3.1.2	<i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> werden in erythroid differenzierten Zellen exprimiert.....	34
3.1.3	<i>TAL1</i> besetzt den <i>FUBP1</i> -Promotor in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie .....	37
3.1.4	Der <i>FUBP1</i> -Promotor wird in Anwesenheit von <i>TAL1</i> aktiviert.....	40
3.1.5	<i>TAL1</i> aktiviert die <i>FUBP1</i> -Expression in verschiedenen Zellen .....	42
3.1.6	Die <i>FUBP1</i> -Expression ist nach einem <i>knock down</i> von <i>TAL1</i> in hämatopoetischen Vorläuferzellen reduziert.....	43
3.1.7	Nach dem <i>knock down</i> von <i>FUBP1</i> ist die <i>GYPA</i> -Expression in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie in ihrer Tendenz leicht vermindert .....	44
3.1.8	Bei verminderter Expression von <i>FUBP1</i> ist die <i>GYPA</i> -Expression während der erythroid-megakaryozytären Differenzierung reprimiert.....	46
3.1.9	Nach dem <i>knock down</i> von <i>FUBP1</i> in hämatopoetischen Vorläuferzellen ist die Bildung erythroider Kolonien reduziert.....	48
3.1.10	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Regulation von <i>FUBP1</i> durch <i>TAL1</i> während der Erythropoese .....	50
3.2	Die Regulation des <i>FUBP1</i> -Zielgens <i>MYC</i> .....	51
3.2.1	Die Expression von <i>MYC</i> wird durch <i>TAL1</i> induziert.....	51
3.2.2	Die Expression des <i>FUBP1</i> -Zielgens <i>MYC</i> wird nach dem <i>knock down</i> von <i>TAL1</i> reprimiert.....	52
3.2.3	<i>MYC</i> wird vermehrt in erythroid differenzierten Zellen exprimiert.....	53
3.2.4	Nach Zellsynchronisation findet die <i>MYC</i> -Expression zeitlich verzögert zu der von <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> statt.....	54
3.2.5	Der <i>MYC</i> -Promotor wird in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie von <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> besetzt.....	56
3.2.6	<i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> werden nicht zusammen auf dem <i>MYC</i> -Promotor detektiert .....	58
3.2.7	Der <i>MYC</i> -Promotor wird durch <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> reguliert .....	59

3.2.8	FUBP1 und TAL1 sind auf dem <i>MYC</i> -Promotor von hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden.....	59
3.2.9	Der <i>MYC</i> -Promotor wird während der erythroiden Differenzierung vermehrt von FUBP1 besetzt.....	62
3.2.10	Zusammenfassung zur Regulation von <i>MYC</i> während der erythroiden Differenzierung .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	<i>FUBP1</i> ist ein neues Zielgen von TAL1 .....	64
4.1.1	TAL1 bindet den <i>FUBP1</i> -Promotor an einer E-Box.....	64
4.1.2	<i>FUBP1</i> wird durch TAL1 aktiviert.....	65
4.2	FUBP1 ist an der erythroiden Differenzierung beteiligt.....	67
4.2.1	<i>FUBP1</i> wird während der erythroiden Differenzierung verstärkt exprimiert ..	67
4.2.2	Keine Hinweise für Einfluss von TAL1 auf <i>FUBP1</i> während megakaryozytärer Differenzierung.....	68
4.2.3	Die Rolle von FUBP1 in der Erythropoese.....	68
4.3	<i>MYC</i> wird von TAL1 und FUBP1 im erythroiden Hintergrund reguliert .....	73
4.3.1	<i>MYC</i> ist ein Zielgen von TAL1 in humanen hämatopoetischen Zellen .....	73
4.3.2	<i>MYC</i> wird auch während der Erythropoese durch FUBP1 reguliert .....	76
4.4	Hypothese zur Regulation von <i>FUBP1</i> und <i>MYC</i> unter Beteiligung von TAL1 während der Erythropoese.....	77
4.5	Anwendungsmöglichkeiten und Ausblick .....	79
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>80</b>
5.1	Material.....	80
5.1.1	Chemikalien .....	80
5.1.2	Geräte .....	82
5.2	Zellbiologische Methoden .....	83
5.2.1	Kultivierungsbedingungen von eukaryotischen Zelllinien .....	83
5.2.2	Anreicherung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	83
5.2.3	Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen.....	84
5.2.4	Kryokonservierung von Zellen .....	84
5.2.5	Differenzierung von Zellen.....	85

---

5.2.6	Serum Entzug in K562-Zellen.....	85
5.2.7	Transfektion .....	85
5.2.8	Transduktion .....	86
5.2.9	FACS Analyse.....	87
5.2.10	Durchflusszytometrie-Sortierung von GFP-positiven Zellen.....	88
5.2.11	Methylzellulose <i>Colony formation assay</i> .....	88
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	89
5.3.1	DNA / RNA-Standardmethoden.....	89
5.3.2	Expressionsvektoren .....	89
5.3.3	Reportergene .....	92
5.3.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	94
5.4	Proteinbiochemische Methoden.....	96
5.4.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten .....	96
5.4.2	Promotoranalysen .....	96
5.4.3	Western Blot-Analyse / Immunoblot.....	97
5.4.4	Chromatin-Immunopräzipitation.....	99
5.4.5	Sequentieller CHIP .....	100
5.5	Auswertung.....	101
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>128</b>
10.1	Publikationen .....	128
10.2	Posterpräsentationen.....	128
10.3	Patente .....	128
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>129</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>130</b>
<b>13</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>131</b>

## 1 Zusammenfassung

Blutzellen haben eine begrenzte Lebensdauer, weshalb das Blut aufgrund der stetigen Erneuerung eines der regenerativsten Organe des Menschen darstellt. Die Homöostase des Blutes wird durch transkriptionelle Regulation erreicht. Einer der essentiellen Masterregulatoren der Hämatopoese ist das *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* (TAL1). Seine Entdeckung erfolgte erstmalig im Zusammenhang mit einer chromosomalen Translokation in einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie (T-ALL, Finger *et al.*, 1989). Neben seiner Rolle während der Selbsterneuerung langzeit-repopulierender hämatopoetischer Stammzellen (LT-HSCs, *long-term* HSCs) ist TAL1 essentiell für die Induktion der Hämatopoese und die erythroide Differenzierung (Elwood *et al.*, 1998; Robb *et al.*, 1995; Rojas-Sutterlin *et al.*, 2014). TAL1 bildet Heterodimere mit E-Proteinen, wodurch DNA mit E-Box-Motiven (CANNTG) gebunden werden kann und Multiproteinkomplexe zur transkriptionellen Regulation rekrutiert werden.

Ein weiterer wichtiger transkriptioneller Regulator ist das *fuse binding protein 1* (FUBP1), das im Gegensatz zu TAL1 ubiquitär exprimiert wird. FUBP1 wurde ursprünglich als transkriptioneller Aktivator des Gens *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*, oft auch *c-MYC* benannt) in undifferenzierten Zellen entdeckt (Avigan *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 1994). Die Mutation bzw. aberrante Expression von FUBP1 ist u.a. mit Oligodendrogliomen und Leberkrebs assoziiert (Bettegowda *et al.*, 2011; Malz *et al.*, 2009; Rabenhorst *et al.*, 2009). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung von FUBP1 während der Hämatopoese. Die Rolle von FUBP1 in der Hämatopoese wurde bisher nur im Kontext von HSCs wissenschaftlich untersucht (Rabenhorst *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016). Auf Basis von mRNA-Profilen wurde für FUBP1 jedoch eine Rolle in der Erythropoese mit einem hohen hierarchischen Rang unter den hämatopoetischen Masterregulatoren vorhergesagt (Novershtern *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2016). Der direkte Nachweis dafür wurde bislang noch nicht erbracht. Da der Promotor von *FUBP1* E-Box-Motive aufweist, könnte eine potentielle Aktivität von FUBP1 während der erythroiden Differenzierung durch TAL1 reguliert werden.

Ein Hinweis auf eine Beteiligung von FUBP1 an der Erythropoese könnte die bekannte Aktivierung von *MYC* durch FUBP1 sein, da *MYC* eine wichtige Rolle in der erythroiden Differenzierung spielt (Anantharaman *et al.*, 2011). Da der Promotor von *MYC* ebenfalls potentielle TAL1-Bindestellen aufweist und *MYC* darüber hinaus bereits als direktes funktionales Zielgen von TAL1 von Kassouf *et al.*, in einer Genom-weiten Studie in murinen fetalen Leberzellen identifiziert wurde (2010), könnte *MYC* auch direkt durch TAL1 reguliert werden. Somit besteht die Möglichkeit eines transkriptionellen Netzwerkes von FUBP1, TAL1 und *MYC* während der erythroiden Differenzierung.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation von *FUBP1* durch TAL1 geprüft und die Rolle von FUBP1 während der hämatopoetischen Differenzierung analysiert werden. Außerdem sollte die Regulation von *MYC* während der erythroiden Differenzierung untersucht werden.

In primären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) und in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie besetzt TAL1 den *FUBP1*-Promotor und vermittelt dessen Aktivierung. Außerdem ist die erythroide Differenzierung von HSPCs nach einem *knock down* von *FUBP1* stark eingeschränkt. Dies könnte durch die eingeschränkte Regulierung von FUBP1-Zielgenen in den FUBP1-defizienten Zellen erklärt werden. Von P27 (CDKN1B), das durch FUBP1 aktiviert wird, ist z.B. bekannt, dass es die Erythropoese induzieren kann (Acosta *et al.*, 2008; Gnanapragasam *et al.*, 2016). Liegt nun nach einem *knock down* von *FUBP1* auch weniger P27 vor, kann die Induktion der Erythropoese eingeschränkt sein.

*MYC*, als prominentestes Zielgen von FUBP1, übernimmt eine wichtige Rolle während der Erythropoese, indem es die vorzeitige Reifung von Vorläuferzellen verhindert (Acosta *et al.*, 2008). Da *MYC* außerdem ca. 15 % der gesamten zellulären Gene positiv reguliert, könnte es im hämatopoetischen Kontext, aktiviert durch FUBP1, als erythroider Amplifikator der Genexpression dienen (Anantharaman *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2006; Frojmark *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2009; Ott, 2014).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ist die Regulation von *MYC* durch FUBP1 während der erythroiden Differenzierung wahrscheinlich. Außerdem wurde die Aktivierung des *MYC*-Promotors in Zellen erythroiden Ursprungs durch TAL1 nachgewiesen. Offen bleibt allerdings die Frage, ob FUBP1 und TAL1 gemeinsam regulierend auf den *MYC*-Promotor wirken, und ob *MYC* auch während der erythroiden Differenzierung von TAL1 reguliert wird.

Nimmt man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit publizierten Daten ergibt sich ein Netzwerk gegenseitiger Regulation, in dem *FUBP1* und *MYC* durch TAL1 aktiviert werden. TAL1 reguliert sich über eine positive *feed forward*-Schleife selbst (Kassouf *et al.*, 2008), weist aber ebenfalls eine Bindestelle für *MYC* auf, wie es auch für beinahe alle der von FUBP1 regulierten Gene der Fall ist. Von *MYC* ist bekannt, dass es sich über eine negative autoregulative Schleife selbst reguliert (Grignani *et al.*, 1990; Lombardi *et al.*, 1990; Penn *et al.*, 1990).

Da TAL1, FUBP1 sowie *MYC* mit Leukämie- bzw. Tumorerkrankungen und schlechten Therapieprognosen assoziiert sind, kann die Aufklärung des regulatorischen Netzwerks dazu beitragen, Therapien zu verbessern. Dies könnte beispielsweise der Einsatz eines FUBP1-Inhibitors in einer mit TAL1 assoziierten T-ALL sein. Weiterhin könnte man FUBP1 auf seine Eignung als Biomarker in T-ALL testen.

## 2 Einleitung

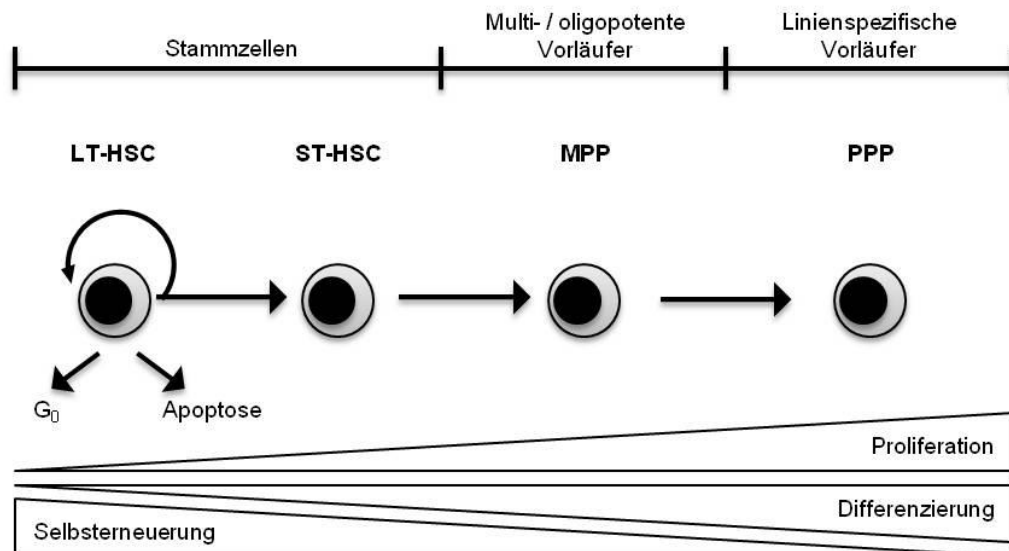
### 2.1 Hämatopoese

Mit Hämatopoese wird die Bildung der Zellen des Blutes während der Embryogenese und im adulten Organismus bezeichnet. Das Blut erfüllt wichtige Funktionen wie die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, Wundheilung und Immunabwehr. Die Lebensdauer der verschiedenen Zellen des Blutes ist aber begrenzt. Während der stetigen Produktion und Erneuerung von Komponenten des Blutsystems werden daher täglich Milliarden reifer Blutzellen gebildet (Laird *et al.*, 2008). Somit ist das Blut eines der regenerativsten Organe des Menschen. Alle zellulären Komponenten gehen dabei aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSC, *hematopoietic stem cell*) hervor (Birbrair *et al.*, 2016).

#### 2.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

HSCs kommen vor allem im Knochenmark vor, man findet sie aber auch in Nabelschnurblut. Sehr wahrscheinlich werden alle adulten Stammzellkompartimente während einer bestimmten Periode der embryonalen Entwicklung gebildet (Golub *et al.*, 2013). HSCs sind multipotent, was bedeutet, dass sie sich in Zelltypen aller hämatopoetischen Entwicklungslinien differenzieren können (Till *et al.*, 1961; 1964), und sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, wodurch sie das Stammzellreservoir erhalten können (Worton *et al.*, 1969; Wu *et al.*, 1968). Aufgrund ihrer Eigenschaften lassen sich verschiedene Populationen von HSCs unterscheiden (siehe Abbildung 2.1; Morrison *et al.*, 1994). Die langzeitrepopulierenden Stammzellen (LT-HSCs, *long-term* HSCs) erneuern sich zeitlebens selbst (Osawa *et al.*, 1996). Aus ihnen gehen die kurzzeitrepopulierenden Stammzellen (ST-HSCs, *short-term* HSCs) hervor, welche nur eine begrenzte Zeit zur Selbsterneuerung fähig sind, dafür aber schneller proliferieren (Yang *et al.*, 2005). Die multipotenten Progenitorzellen (MPPs) entwickeln sich aus den ST-HSCs. Sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung größtenteils oder vollständig verloren, sind aber zu noch schnellerer Proliferation in der Lage (Passegue *et al.*, 2005). Vermutlich gehen embryonale und adulte Hämatopoese auf unterschiedliche Stammzellpopulationen zurück (Busch *et al.*, 2015).

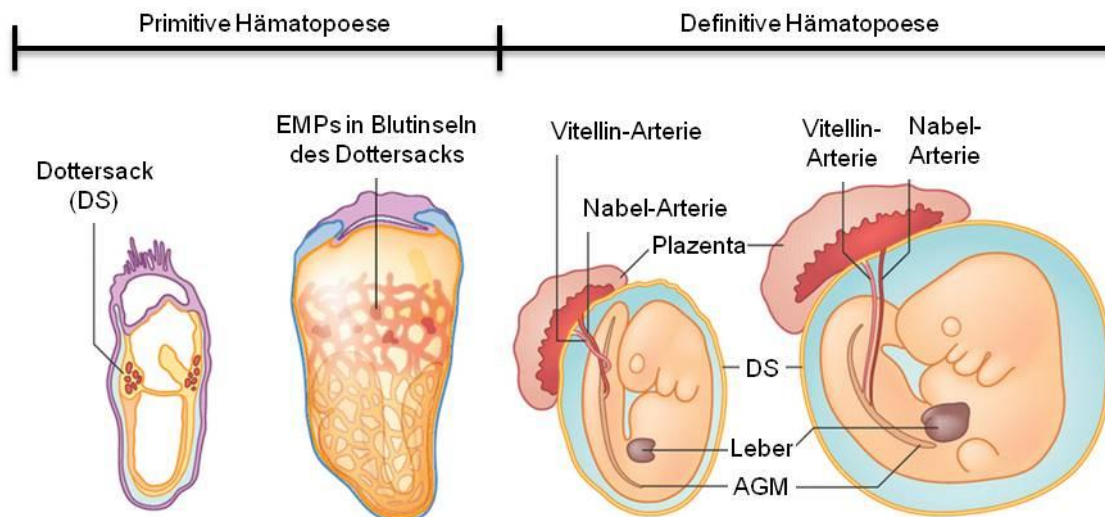




**Abbildung 2.1: Die verschiedenen Populationen von hämatopoetischen Stammzellen unterscheiden sich in ihrem Potential zur Selbsterneuerung und Differenzierung.** Stammzellen verfügen über das größte Potential zur Selbsterneuerung, das mit fortschreitender Differenzierung abnimmt. Umgekehrt dazu nimmt die Proliferation der hämatopoetischen Zellen im Verlauf der Differenzierung zu (modifiziert nach Pina *et al.*, 2007). HSC - hämatopoetische Stammzelle, *hematopoietic stem cell*; LT-HSC - langzeitrepopulierende HSC, *long-term HSC*; MPP - multipotente Vorläuferzelle, *multipotent progenitor*; PPP - pluripotente Vorläuferzelle, *pluripotent progenitor*; ST-HSC - kurzzeitrepopulierende HSC, *short-term HSC*.

### 2.1.2 Embryonale Hämatopoese

Die embryonale Hämatopoese lässt sich in eine primitive und in eine definitive Phase einteilen. Während der primitiven Hämatopoese beginnt die Blutbildung in den Blutinseln des Dottersacks (siehe Abbildung 2.2). Man nimmt an, dass sie aus Hämangioblasten hervorgehen, welche die gemeinsamen Vorläufer von endothelialen und hämatopoetischen Zellen sind (Lancrin *et al.*, 2010; Lancrin *et al.*, 2009; Loges *et al.*, 2004). Der Hämangioblast bildet neben Endothelzellen auch primitive Erythrozyten, welche sehr groß sind und, im Gegensatz zu den definitiven, noch einen Zellkern besitzen (Kingsley *et al.*, 2013). Zusätzlich beginnt auch die Bildung erster Megakaryozyten und Makrophagen (Bertrand *et al.*, 2005; Herbomel *et al.*, 1999). Myeloerythroide Vorläufer müssen zur Differenzierung aus dem Dottersack in die Leber migrieren (Palis *et al.*, 1999), in welcher transitorisch eine starke Expansion von HSCs stattfindet (Golub *et al.*, 2013). Diese HSCs emigrieren dann zur definitiven Blutbildung in Thymus, Milz und Knochenmark (Rieger *et al.*, 2012). Zur Herkunft der definitiven HSCs werden vor allem zwei Theorien diskutiert. Die erste besagt, dass sie aus den primitiven Vorläuferzellen des extraembryonalen Dottersacks über die Blutzirkulation in die Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) gelangen und sich dort ansiedeln (Golub *et al.*,

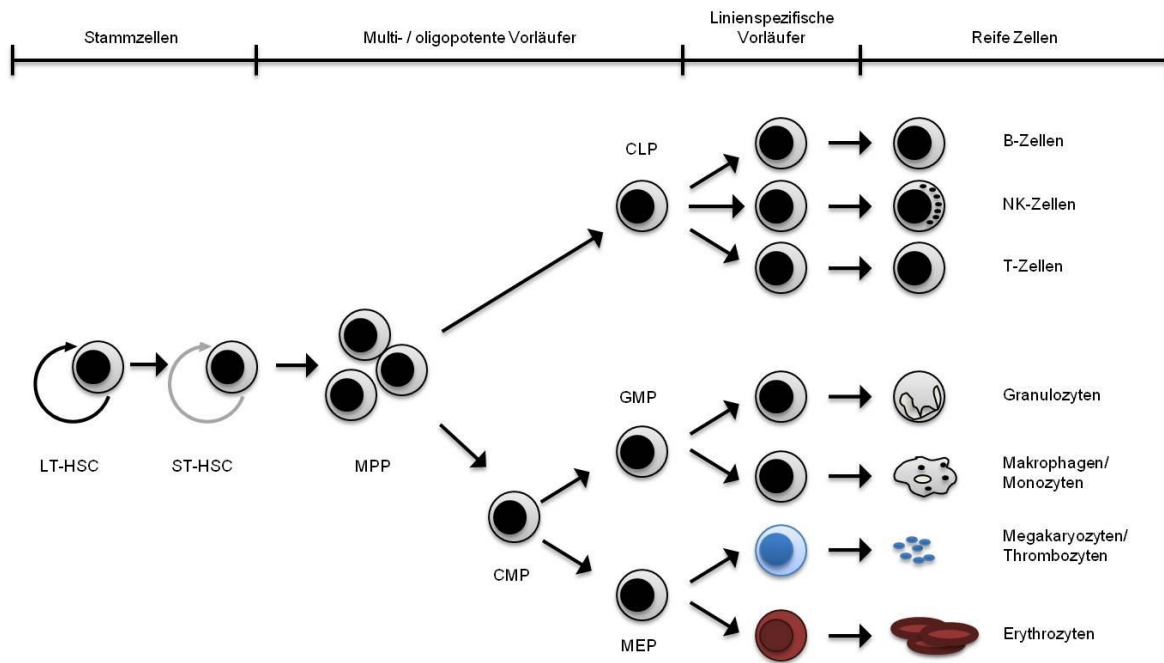


**Abbildung 2.2: Die embryonale Hämatopoese erfolgt im Embryo an unterschiedlichen Orten.** Die primitive Phase der Hämatopoese beginnt im Embryo mit der Bildung primitiver erythroider Vorläuferzellen im Dottersack, in dem sich die Blutinseln bilden. Während der definitiven Hämatopoese wandern hämatopoetische Stammzellen (HSCs) aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM), der Vitellin-Arterie, der Nabelarterie und der Plazenta zur Blutbildung in die Leber. In der späten Phase der Gestation werden von hier aus Thymus, Milz und Knochenmark besiedelt (modifiziert nach Yoder et al. 2014). EMPs – erythromyeloide Progenitorzellen.

2013; Le Douarin *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 1970; Tavian *et al.*, 2010). Die zweite Theorie postuliert, dass die definitiven HSCs intraembryonal erst in der AGM-Region aus spezialisierten hämogenischen Endothelialzellen (HE-Zellen) entstehen und danach die anderen blutbildenden Organe besiedelt werden (Cumano *et al.*, 1996; de Bruijn *et al.*, 2002; Godin *et al.*, 2002; Medvinsky *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1994). Ein möglicher zusätzlicher Entstehungsort von HSCs ist auch die Plazenta (siehe Abbildung 2.2; Gekas *et al.*, 2005; Mikkola *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Adulte Hämatopoese

Mit der Geburt beginnt die adulte Hämatopoese, welche vor allem im Knochenmark erfolgt und durch die Expansion und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen definiert ist (Cumano *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 1976). Diese erhalten durch ein Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung die Homöostase des hämatopoetischen Systems im adulten Organismus. Dabei unterscheiden sich die adulten von den fetalen HSCs dadurch, dass sie sich vermehrt in einem Stadium der Quieszenz befinden (Bowie *et al.*, 2007). Die Hämatopoese ist ein hierarchisches System, bei denen sich aus den multipotenten HSCs, und nachfolgend den MPPs und über weitere pluripotente Vorläuferzellen, ausgereifte Zellen aller hämatopoetischen Entwicklungslinien ausbilden.



**Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese.** In der Hämatopoese bilden sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) multipotente Vorläuferzellen (MPPs, *multipotent progenitor*), die über linienspezifische Vorläuferzellen ausreifen. Die lymphoide Linie bringt die Zellen der Immunantwort hervor, während aus der myeloiden Linie Granulozyten, Makrophagen / Monozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten hervorgehen (modifiziert nach Ferreira *et al.*, 2005). CLP - lymphoide Vorläuferzelle, *common lymphoid progenitor*; CMP - myeloide Vorläuferzelle, *common myeloid progenitor*; GMP - granulozytäre-monozytäre Vorläuferzelle, *granulocyte-monocyte progenitor*; LT-HSC - langzeitrepopulierende HSC, *long-term HSC*; MEP - megakaryozytäre-erythroide Vorläuferzelle, *megakaryocyte-erythroid progenitor*; NK-Zelle - natürliche Killerzelle; ST-HSC - kurzzeitrepopulierende HSC, *short-term HSC*.

#### 2.1.4 Hämatopoetische Entwicklungslinien

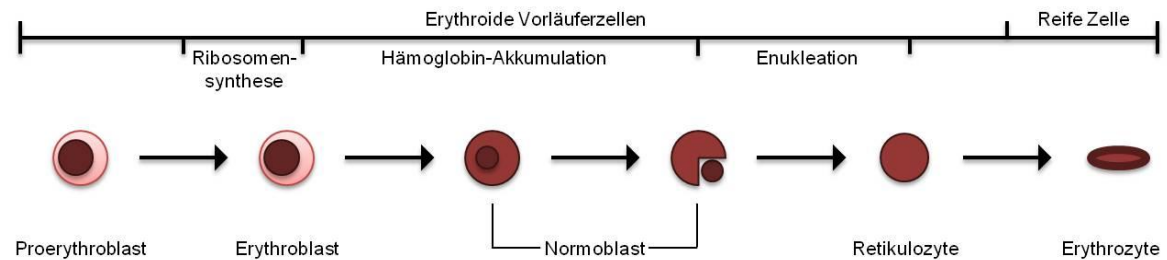
Die Hämatopoese gliedert sich in die Lymphopoese und die Myelopoese. Durch die Lymphopoese werden die Zellen der Immunabwehr gebildet: B- und T-Zellen, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Myelopoese spaltet sich weiter auf in die granulozytäre-monozytäre Linie, aus der Granulozyten und Makrophagen hervor gehen und in die megakaryozytäre-erythroide Linie, die Erythrozyten und Megakaryozyten / Thrombozyten hervor bringt (siehe Abbildung 2.3). Ob eine HSC in die Selbsterneuerung eintritt, proliferiert oder differenziert, wird durch Wachstumsfaktoren, sogenannte Zytokine, reguliert (siehe unten). Den Differenzierungsstatus kann man über ein spezifisches Muster aus Oberflächenantigenen bestimmen (siehe unten). Als zentrales Thema dieser Arbeit wird die Erythropoese ausführlicher im nächsten Punkt beschrieben.

### 2.1.5 Erythropoese

Die Erythropoese dient der Bildung von Erythrozyten (roten Blutkörperchen), die für den Sauerstofftransport zu allen Geweben sorgen. Außerdem transportieren sie von dort auch teilweise Kohlendioxid zurück in die Lunge. Es gibt drei Wellen der Erythropoese. Die primitive Erythropoese findet im Dottersack statt und bringt Erythrozyten mit Nukleus hervor, der erst während der Zirkulation im Blutkreislauf ausgestoßen wird (Knoll, 1928; McGrath *et al.*, 2008; McGrath *et al.*, 2005). Die erste Welle der definitiven Erythropoese erfolgt in der fetalen Leber aus vom Dottersack emigrierten Vorläuferzellen und wird zur zweiten Welle der definitiven Erythropoese, wenn sich die Produktion von kernlosen Erythrozyten ins Knochenmark verlagert (Chasis *et al.*, 2008; Palis, 2008, 2014). Ein gesunder Erwachsener bildet ca.  $2 \times 10^6$  Erythrozyten pro Minute (Dzierzak *et al.*, 2013).

Aus HSCs werden über MPPs die multipotenten myeloiden Vorläuferzellen (CMPs, *common myeloid progenitor*) gebildet. Diese entwickeln sich weiter zu oligopotenten megakaryozytär-erythroiden Vorläuferzellen (MEPs, *megakaryocyte-erythroid progenitor*) (Debili *et al.*, 1996; Palis *et al.*, 2001). Die ersten Stadien der erythroiden Entwicklungslinie sind die *burst forming unit-erythrocyte* (BFU-E) und die *colony forming unit-erythrocyte* (CFU-E) und durch ihre Abhängigkeit von EPO gekennzeichnet (Stephenson *et al.*, 1971). Die Reifung vom Proerythroblast zum Erythroblast findet an den sogenannten erythroblastischen Inseln statt (Chasis *et al.*, 2008). Mit jeder Zellteilung nimmt das Volumen des Erythroblasten kontinuierlich ab, er produziert und akkumuliert Hämoglobin und der Kern verkleinert sich durch die Kondensation des Chromatins (Barminko *et al.*, 2016). Durch das im Hämoglobin enthaltene Eisen färben sich die Zellen rot. Im Normoblast wird zusätzliches Volumen für das Hämoglobin durch den Abbau von Organellen geschaffen (Lourenço *et al.*, 1978). In diesem Stadium schrumpft der Kern durch die Kondensation des Chromatins und wird schließlich ausgestoßen (Enukleation), was den Übergang zur Retikulozyte markiert (Barminko *et al.*, 2016; Ney, 2011). Diese tritt vom Knochenmark in die Blutbahn über und reift dort aus (siehe Abbildung 2.4).

Von der HSC bis zur reifen Erythrozyte vergehen etwa sieben Tage. Anschließend erreichen Erythrozyten eine Lebensdauer von bis zu vier Monaten (Shemin *et al.*, 1946). Durch Alterungsprozesse verändert sich die Plasmamembran der Erythrozyten und verliert an Flexibilität (Bartosz, 1991). Diese geänderte Struktur wird von Makrophagen erkannt und durch Phagozytose werden die seneszenten Erythrozyten abgebaut (Bosman *et al.*, 2005). Aufgrund der für Säugetiere einzigartigen Kernlosigkeit der Erythrozyten können sich diese nicht weiter teilen. Um die abgebauten Erythrozyten zu ersetzen, müssen neue gebildet werden. Dies wird über Erythropoetin (EPO; siehe Zytokine) reguliert. In der Niere wird über den Sauerstoffpartialdruck des an das Hämoglobin gebundenen Sauerstoffes die Sauerstoffsättigung detektiert. Bei zu geringen



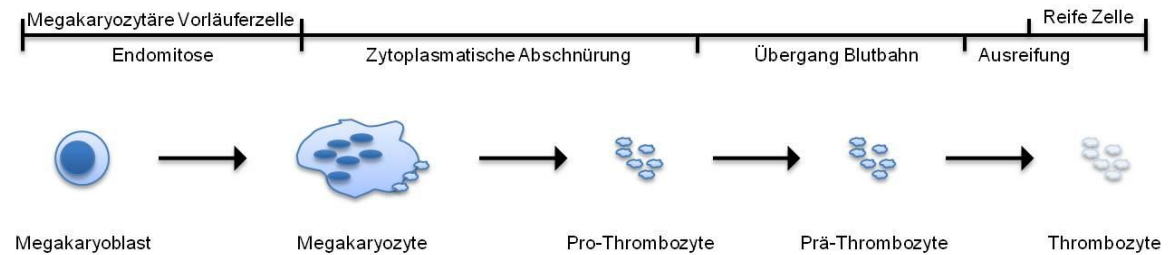
**Abbildung 2.4: Entwicklung in der erythroiden Linie zur reifen Erythrozyte.** Aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) entwickelt sich über multipotente Vorläuferzellen (MPP, *multipotent progenitor*) der Proerythroblast als erythroider Vorläufer. Mit der vermehrten Synthese von Ribosomen entwickelt dieser sich zum Erythroblasten, in dem Hämoglobin akkumuliert wird. Mit der Kondensierung des Nukleus beginnt das Normoblast-Stadium, das mit der Enukleation im Retikulozytenstadium endet. Die Retikulozyte geht in die Blutbahn über und reift dort zur Erythrozyte aus (modifiziert nach Koury *et al.*, 2015).

Sauerstoffwerten wird die Produktion von EPO aktiviert und so die Bildung neuer Erythrozyten induziert (Bauer *et al.*, 1989; Wenger *et al.*, 2010).

Für die Immunophänotypisierung von Zellen der erythroiden Entwicklungslinie kann CD71 (Transferrin-Rezeptor; siehe Oberflächenmarker) als früher Marker verwendet werden, während Glycophorin A (GYPA, auch CD235a; siehe Oberflächenmarker) auf ausgereiften Erythrozyten vorkommt und somit für die späte erythroide Differenzierung genutzt werden kann. Daher ist auch die Expression des Gens *GYPA* mit der erythroiden Differenzierung assoziiert. Ein weiteres Gen, welches für die Reifung von Erythrozyten benötigt wird ist *Kruppel like factor 1 (KLF1)*; siehe transkriptionelle Regulation der Hämatopoese). Dieser Transkriptionsfaktor induziert die Expression von adulten beta-Globinen und weiteren für die erythroide Differenzierung benötigten Genen. Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren der Erythropoese sind TAL1, GATA1, LMO2 und LDB1 (Kerenyi *et al.*, 2010).

### 2.1.6 Megakaryopoese

Während der Megakaryopoese werden Thrombozyten (Blutplättchen) gebildet, daher wird dieser Prozess auch Thrombopoese genannt. Bei einer Verletzung der Blutgefäße heften sich Thrombozyten aneinander und an das umgebende Gewebe so dass die Verletzung geschlossen wird. Sie entstehen durch die Abschnürung des Zytoplasmas von Megakaryozyten (Thrombopoese) und besitzen selbst keinen Zellkern. Die Megakaryopoese kann erstmals im Dottersack beobachtet werden und wird mit der primitiven und definitiven Erythropoese über die gemeinsamen Vorläuferzellen MEPs in Zusammenhang gebracht (Tober *et al.*, 2007; 2008; Xie *et al.*, 2003). Später verlagert sich die Expansion der megakaryozytischen Vorläufer in die fetale Leber (Wen *et al.*, 2011). Im adulten Organismus sind Megakaryozyten im Knochenmark lokalisiert. Sie sind dort mit



**Abbildung 2.5: Entwicklung von Thrombozyten in der megakaryozytären Linie.** Aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) entsteht über multipotente Vorläuferzellen (MPPs, *multipotent progenitors*) der Megakaryoblast in der megakaryozytischen Entwicklungslinie. Durch Kernteilungen in Abwesenheit von zytoplasmatischer Teilung (Endomitose) entsteht die polyploide Megakaryozyte. Durch zytoplasmatische Abschnürung entstehen Pro-Thrombozyten, die beim Übergang in den Blutkreislauf zu Prä-Thrombozyten interkonvertieren. Diese reifen dann zu Thrombozyten aus (modifiziert nach Bianchi *et al.*, 2016).

einem Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  die größten Zellen und machen einen Anteil von ca. 0,01 % der kernhaltigen Zellen aus (Nakeff *et al.*, 1974; Pease, 1956).

Während der Megakaryopoese gehen aus den MEPs, den gemeinsamen Vorläuferzellen der erythroiden und megakaryozytären Linie, durch den Einfluss von Thrombopoetin (TPO) als erste megakaryozytäre Vorläufer die *burst forming unit- megakaryocyte* (BFU-MK) und die *colony forming unit- megakaryocyte* (CFU-MK) hervor. Der Megakaryoblast entwickelt sich durch Endomitose zur Megakaryozyte. Die Endomitose bezeichnet die Kernteilung, ohne dass eine Teilung des Zytoplasmas erfolgt, so dass Megakaryozyten polyploid mit einem Chromosomensatz bis 128 N sind (Machlus *et al.*, 2013). Die Megakaryozyten entlassen durch zytoplasmatische Abschnürung Pro-Thrombozyten, die zu Prä-Thrombozyten interkonvertieren, sobald sie sich im Blutkreislauf befinden. Durch die weitere Teilung reifen sie dann zu den ca. 2-3  $\mu\text{m}$  großen Thrombozyten aus (siehe Abbildung 2.5; Paulus, 1975). Eine Megakaryozyte kann 2000 bis 5000 Thrombozyten produzieren (Branehog *et al.*, 1975; Long, 1998). Insgesamt werden jeden Tag ca.  $10^{11}$  Thrombozyten im gesunden Erwachsenen gebildet, die eine Lebensspanne von bis zu zehn Tagen haben (Kaushansky, 2005b; Wen *et al.*, 2011).

Das wichtigste Zytokin der Megakaryopoese ist Thrombopoetin (TPO; siehe Zytokine). Dieses Hormon reguliert die Megakaryopoese über eine autoregulatorische Schleife. Hochaffine Thrombopoetinrezeptoren an der Oberfläche der Thrombozyten können im Blutkreislauf zirkulierendes TPO binden. Das so gebundene TPO kann daher nicht mehr zur Neubildung weiterer Thrombozyten beitragen (Kaushansky, 2005a).

Oberflächenmarker, welche zur Immunophänotypisierung von Zellen der megakaryozytären Entwicklungslinie verwendet werden, sind u.a. CD41 und CD42b (siehe Oberflächenmarker). Sie spielen eine Rolle in der Aggregation von Thrombozyten

und werden daher nur in dieser Entwicklungslinie exprimiert. Für die megakaryozytäre Entwicklung sind TAL1, GATA1 und RUNX1 die wichtigsten Transkriptionsfaktoren (siehe transkriptionelle Regulation der Hämatopoese).

### 2.1.7 Zytokine

Im Laufe der Erforschung des Blutsystems wurde eine Reihe von Zytokinen identifiziert, die eine wichtige Bedeutung an verschiedenen Stellen der Hämatopoese haben. Dazu gehören der Stammzellofaktor (SCF), der Ligand der *fms related tyrosine kinase 3* (FLT3LG), Interleukin 3 (IL3), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 9 (IL9), EPO und TPO.

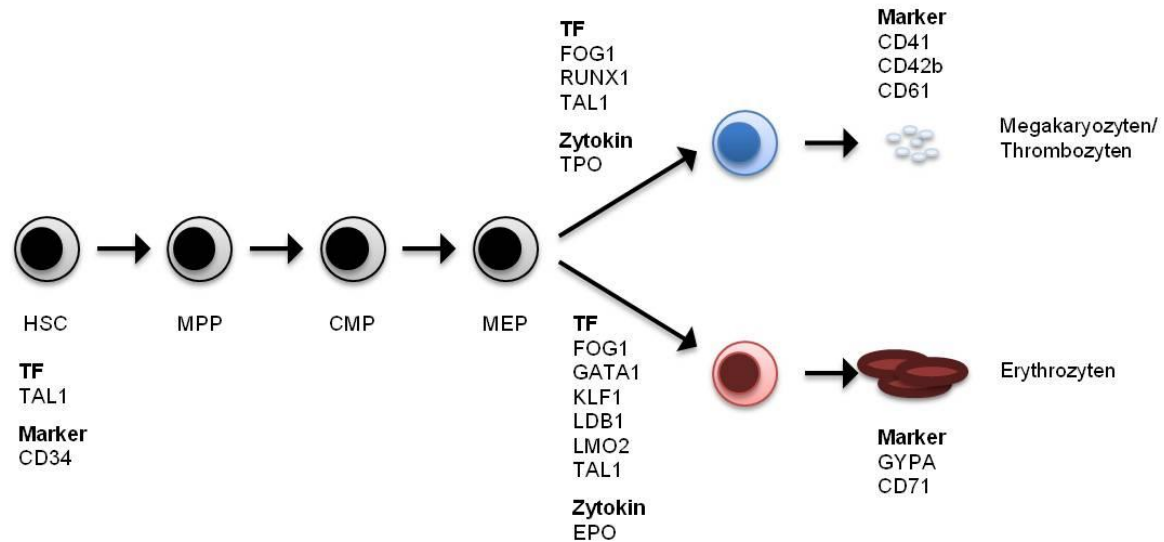
SCF hat eine zentrale Rolle in der Erhaltung von HSCs inne und bindet an den c-KIT-Rezeptor (CD117). Die Abwesenheit von SCF ist letal. Durch SCF wird das Überleben *in vitro* und die Selbsterneuerung *in vivo* von HSCs gefördert (Broudy, 1997). Auch auf das Überleben anderer hämatopoetischer Vorläuferzellen hat dieses Zytokin eine positive Wirkung (Keller *et al.*, 1995). So ist SCF in vielen Medien für die Kultivierung primärer hämatopoetischer Zellen enthalten.

FLT3LG bindet an den Rezeptor FLT3, der strukturell mit dem c-KIT Rezeptor verwandt ist (Matthews *et al.*, 1991). FLT3LG agiert, ebenso wie SCF, vor allem zu einem frühen Zeitpunkt der Hämatopoese und stimuliert *in vitro* das Wachstum von HSCs. Allerdings ist die Wirkung von FLT3LG nur sehr begrenzt, wenn es als einziges Zytokin eingesetzt wird. Seine Bedeutung liegt in der Wirkungsverstärkung anderer Zytokine, wobei diese Verstärkung in Kombination mit SCF um ein vielfaches gesteigert werden kann (Wodnar-Filipowicz, 2003).

IL3 ist ein Zytokin mit pleiotropen Effekten auf verschiedene Zellen des hämatopoetischen Systems, auch wenn es für die Hämatopoese nicht essentiell ist (Ihle, 1992). So unterstützt IL3 das Wachstum, induziert die Differenzierung und die Festlegung auf eine Entwicklungslinie und hat einen positiven Effekt auf das Überleben von Zellen (Lindemann *et al.*, 1993). Gerade wegen seiner Verstärkung von Wachstum und Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen wird es nicht nur zur Kultivierung primärer hämatopoetischer Zellen sondern auch für klinische Anwendungen eingesetzt.

IL6 ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, zu dessen pleiotropen Wirkungen auch die Regulation der Hämatopoese gehört (Ataie-Kachoe *et al.*, 2014). Alleine eingesetzt hat IL6 jedoch keine distinkten Effekte auf die Hämatopoese, es wirkt vor allem synergistisch mit anderen Zytokinen. Gemeinsam mit IL3 induziert IL6 die Bildung von pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen und ist somit ein potenter Ko-Faktor in der *in vitro* Expansion von HSCs (Heike *et al.*, 2002).





**Abbildung 2.6: Übersicht über ausgewählte Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarker und Zytokine in der megakaryozytär-erythroiden Entwicklung.** Dargestellt sind Transkriptionsfaktoren (TFs), die als Masterregulatoren der Megakaryopoese und Erythropoese gelten, wobei TAL1 auch in hämatopoetischen Stammzellen zur Selbsterneuerung benötigt wird. Anhand verschiedener Oberflächenmarker lässt sich die Entwicklungslinie von hämatopoetischen Zellen bestimmen. Das Zytokin Thrombopoetin (TPO) induziert die megakaryozytäre Entwicklung, während Erythropoetin (EPO) essentiell für die Erythropoese ist (modifiziert nach Ferreira *et al.*, 2005). CMP - myeloide Vorläuferzelle, *common myeloid progenitor*; HSC - hämatopoetische Stammzelle; MEP - megakaryozytär-erythroide Vorläuferzelle, *megakaryocyte-erythroid progenitor*; TF - Transkriptionsfaktor.

Auch IL9 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren agiert (Yang, 1992). Seine bekannten Effekte waren zunächst auf das Immunsystem begrenzt (Goswami *et al.*, 2011). Zusammen mit u.a. SCF und EPO wird jedoch die erythroide Kolonienbildung von HSCs angeregt (Donahue *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990). Zusätzlich steigert IL9 in Kombination mit u.a. SCF und TPO die Formierung megakaryozytärer Kolonien (Fujiki *et al.*, 2002).

EPO wird vor allem in der Niere produziert und ist essentiell für die Erythropoese (siehe Abbildung 2.6). Die Wirkung erfolgt über die Bindung von EPO an den EPO-Rezeptor (EPOR), der vor allem auf HSCs im Knochenmark zu finden ist. Durch die Rezeptorbindung wird der JAK2 / STAT5 Signalweg aktiviert (Hodges *et al.*, 2007). Die durch EPO angeregte Produktion von Erythrozyten ist so stark, dass Derivate dieses Glykoproteins als sogenannte *erythropoiesis stimulating agents* (ESA) bei Anämien als Medikament eingesetzt werden (Debeljak *et al.*, 2012). EPO wird auch in nicht-hämatopoetischen Geweben gefunden, wo es u.a. vor Apoptose und Entzündungsprozessen schützt, die durch Hypoxie, Verletzung oder Vergiftung ausgelöst



werden, was ebenfalls medizinisch genutzt wird (Chateauvieux *et al.*, 2011; Lombardero *et al.*, 2011).

TPO wird in Leber, Niere und Knochenmark produziert und ist ebenfalls ein essentielles Zytokin der Hämatopoese, das eine zentrale Rolle in der Erhaltung von HSCs und der Megakaryopoese inne hat (siehe Abbildung 2.6; Kaushansky, 1998; 2005b). TPO bindet an seinen Rezeptor MPL (CD110), wodurch verschiedene Signalwege, darunter JAK / STAT, aktiviert werden (de Sauvage *et al.*, 1994; Gurney *et al.*, 1995; Kaushansky, 1994; Kaushansky *et al.*, 1994; Lok *et al.*, 1994). Durch TPO wird die Proliferation megakaryozytärer Vorläuferzellen und die Differenzierung in Megakaryozyten reguliert. TPO ist der primäre Faktor für die Bildung von Thrombozyten, obwohl deren finale Reifung von TPO unabhängig ist (Hitchcock *et al.*, 2014).

### **2.1.8 Oberflächenmarker**

Zur Immunophänotypisierung von Zellen werden Oberflächenmarker von Zellen benutzt, die als *cluster of differentiation* (CD) bezeichnet werden. In der Hämatopoese ist CD34 ein wichtiger Marker für HSCs. CD41 und CD42b werden in der megakaryozytären Entwicklungslinie exprimiert, während wichtige Marker für die erythroide Differenzierung CD71 und CD235a sind.

Das CD34-Antigen wird von HSCs und multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet, weshalb Aufreinigungsverfahren von HSCs oftmals auf einem gegen CD34 gerichteten Antikörper basieren (Civin *et al.*, 1984). Außerdem wird es von vaskulären Endothelzellen exprimiert (Fina *et al.*, 1990). Die genaue Rolle dieses Sialomucins ist aber noch unbekannt. Aufgrund des Expressionsmuster wird eine Rolle bei der Regulation der Hämatopoese vermutet. Aus einer Reihe von Versuchen mit *Cd34* Mäusen schlossen Nielsen *et al.* (2009), dass CD34 als Anti-Adhäsionsmolekül wirkt und verhindert, dass transplantierte HSCs an ungeeigneten Orten anwachsen. Außerdem vermuten die Autoren, dass CD34 durch seine Eigenschaft als Anti-Adhäsionsmolekül auf vaskulären Endothelialzellen Blutgefäße vor dem Kollabieren schützt. Es gibt aber auch Hinweise, dass CD34 als Adhäsionsmolekül in Lymphknoten exprimiert, das *homing* von naiven Lymphozyten unterstützt (Berg *et al.*, 1998; Suzawa *et al.*, 2007).

CD41 ist auch als Integrin-Untereinheit alpha-IIb bekannt, welche zusammen mit der Untereinheit beta-3 (CD61) einen Integrin-Adhäsions-Zellrezeptor bildet. Dieser Rezeptor vermittelt die Aggregation von Thrombozyten (Phillips *et al.*, 1988). Die Stimulation mit TPO allein reicht aus, dass der Integrin-Adhäsions-Zellrezeptor gebildet wird (Kaushansky *et al.*, 1994; Zeigler *et al.*, 1994). Aufgrund seiner Assoziation mit Thrombozyten ist CD41 ein geeigneter Marker für die megakaryozytäre Differenzierung.

Als CD42b wird die alpha-Untereinheit des Glykoproteins Ib *platelet* bezeichnet. Zusammen mit der beta-Untereinheit wird ein Rezeptor für den von Willebrand-Faktor

(VWF) gebildet. Zusammen mit weiteren Ko-Faktoren erleichtert dieser Rezeptorkomplex die initiale Adhäsion von Thrombozyten an das vaskuläre Endothelium nach einer Verletzung. Wie bei CD41, induziert TPO die Expression des Megakaryozyten-spezifischen CD42b *in vitro*.

CD71 ist die Einordnung des Transferrin Rezeptors in das CD-System. Dieser Rezeptor nimmt Eisen durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose im Kontext der Hämoglobinsynthese auf. Das Eisen wird als Bestandteil des Hämoglobins für den Sauerstofftransport im Blut benötigt (Aisen, 2004). Durch die Expression auf Zellen der erythroiden Entwicklungslinie in verschiedenen Reifestadien eignet sich CD71 als Marker der erythroiden Differenzierung (Dong *et al.*, 2011). Da Hämoglobin jedoch nicht mehr in ausgereiften Erythrozyten gebildet wird, ist CD71 ein Marker früherer Stadien der erythroiden Differenzierung.

CD235a ist das Synonym für Glycophorin A (GYPA), welches eines der wichtigsten Sialoglycoproteine auf der Membran von Erythrozyten ist. Zusammen mit Glycophorin B bildet es die Grundlage für die Einteilung in das MNS Blutgruppensystem (Reid, 2009). Schon seit 1981 wird es als Marker für erythroide Differenzierung verwendet (Andersson *et al.*, 1981).

### **2.1.9 Transkriptionelle Regulation der Hämatopoese**

Die Grundlage für die Regulation der Hämatopoese bilden Transkriptionsfaktoren. Dabei werden diese Proteine ihrerseits u.a. durch Wachstumsfaktoren / Zytokine, andere Transkriptionsfaktoren, Ko-Faktoren oder posttranslationale Modifikationen reguliert (Lausen, 2013; Zhu *et al.*, 2002). Die Wirkung wird durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA erreicht, wobei sie die Genexpression ihrer Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren können (Mitchell *et al.*, 1989; Ptashne *et al.*, 1997). Die wichtigsten Mechanismen sind dabei die Stabilisierung bzw. Blockierung der RNA-Polymerase / DNA-Bindung und die Katalyse von Histonmodifikationen (Gill, 2001; Narlikar *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1999). Oftmals benötigen Transkriptionsfaktoren außerdem Ko-Faktoren um ihre Wirkung zu entfalten. So können sie Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren rekrutieren. Von der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktor-Komplexes hängt ab, ob dieser als Aktivator oder Repressor wirkt (Fujiwara *et al.*, 2013; Gill, 2001; Kerényi *et al.*, 2010; Lecuyer *et al.*, 2002). Die Expression von hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren bestimmt, ob HSCs sich selbst erneuern, oder eine bestimmte Entwicklungslinie eingeschlagen bzw. unterdrückt wird (Wilkinson *et al.*, 2013). In HSCs kommt das Phänomen des sogenannten *lineage priming* vor (Orkin, 2003). Dabei sind in HSCs Transkripte von Markern multipler hämatopoetischer Entwicklungslinien auf einem niedrigen Niveau nachweisbar, HSCs ist somit eine Differenzierung in mehrere Entwicklungslinien möglich. Auf einen Impuls, welcher die Linienentscheidung festlegt,

beginnt dann das Expressionsprogramm eines Transkriptionsfaktors zu dominieren, woraufhin die Expression der Zielgene anderer Transkriptionsfaktoren abnimmt.

Zentrale Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese sind TAL1, *GATA binding protein 1* (GATA1), *friend of gata1* (FOG1), KLF1, *Spi-1 proto-oncogene* (SPI1, auch PU.1 genannt) und *runt related transcription factor 1* (RUNX, auch AML1; siehe Abbildung 2.6). Die wichtige Rolle dieser Transkriptionsfaktoren wird daran deutlich, dass deren Fehlfunktion oftmals mit Leukämien assoziiert ist. Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit wird der Transkriptionsfaktor TAL1 ausführlicher in einem eigenen Kapitel behandelt.

GATA1 ist ein Masterregulator der erythroiden Entwicklung. Zusätzlich wurde im Zebrafisch-Modell gezeigt, dass GATA1 die nicht-erythroide myeloide Differenzierung reprimiert (Rhodes *et al.*, 2005). GATA1 ist für die Erythropoese essentiell und auch die megakaryozytäre Differenzierung kann ohne GATA1 nicht ohne Defekte ablaufen (Fujiwara *et al.*, 1996; Pevny *et al.*, 1991; Shivdasani *et al.*, 1997; Vyas *et al.*, 1999). Dieses Zinkfingerprotein erkennt die Konsensussequenz (A/T)GATA(A/G), welche zuerst im *Enhancer*-Bereich des humanen *beta-Globin*-Gens (*HBB*) identifiziert wurde (Evans *et al.*, 1989; Wall *et al.*, 1988). Außerdem finden sich GATA-Bindestellen in nahezu allen untersuchten für die Erythropoese bzw. Megakaryopoese spezifischen Genen (Orkin, 1992; Weiss *et al.*, 1995). Die direkten Zielgene von GATA1 werden etwa zu gleichen Teilen aktiviert bzw. reprimiert (Fujiwara *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). GATA1 reguliert die erythroide Genexpression gemeinsam mit TAL1. Bei den durch GATA1 aktivierten Genen ist häufig eine Anreicherung von TAL1-Bindestellen zu beobachten, außerdem liegen GATA1 und TAL1 gemeinsam im pentamerischen Komplex (siehe TAL1) vor, welcher die Expression erythroider Gene steuert (Cheng *et al.*, 2009). Im pentamerischen Komplex interagiert GATA1 außerdem noch mit LMO2, LDB1 und E47 / E12. Weitere Interaktionspartner von GATA1 sind FOG1, KLF1 und SPI1, wobei die Interaktion mit SPI1 physisch ist und beide Transkriptionsfaktoren um Zielgene konkurrieren (Cantor *et al.*, 2002).

Das Zinkfingerprotein FOG1 ist, ebenso wie GATA1, essentiell für die erythroide Differenzierung, hat aber im Gegensatz zu GATA1 auch eine essentielle Rolle in der Megakaryopoese inne (Tsang *et al.*, 1998). Mit GATA1 interagiert es über vier seiner neun Zinkfinger (Fox *et al.*, 1999). Die beiden Transkriptionsfaktoren werden während der embryonalen Entwicklung, sowie in erythroiden und megakaryozytären Zellen ko-exprimiert (Tsang *et al.*, 1997). Ohne eine direkte physische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren findet *in vitro* keine normale Hämatopoese statt (Crispino *et al.*, 1999).

Ein weiteres Zinkfingerprotein mit essentieller Bedeutung für die Erythropoese ist KLF1 (Miller *et al.*, 1993). *Klf1 knockout* Mäuse sterben schon als Fötus an schwerer Anämie,

da *HBB* nicht exprimiert wird. Außerdem vermutet man, dass KLF1 an dem Umschalten der Expression von embryonalen zu adultem *beta-Globin* beteiligt ist (Perkins *et al.*, 1996; Wijgerde *et al.*, 1996). Die Expression von KLF1 ist auf Zellen der erythroiden Entwicklungslinie beschränkt (Miller *et al.*, 1993). Trotz seiner essentiellen Rolle in der Erythropoese sind nicht viele Zielgene von KLF1 bekannt. Die Ergebnisse der experimentellen Kombination von ChIP-seq Analysen mit Expressionsanalysen deuten aber auf eine überwiegend aktivierende Funktion von KLF1 in erythroiden Zellen hin (Tallack *et al.*, 2010). Die Autoren untersuchten außerdem die Abstände zu TAL1- bzw. GATA1 Bindestellen. KLF1 interagiert sowohl mit TAL1 als auch mit GATA1, jedoch vermutlich in voneinander unabhängigen Proteinkomplexen.

SPI1 (auch PU.1 genannt) gehört zur Familie der ETS-Domänen-Transkriptionsfaktoren und aktiviert die Expression von Zielgenen während der myeloiden und B-lymphoiden Entwicklung, für die SPI1 eine essentielle Funktion inne hat (Hromas *et al.*, 1993; McKercher *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1994). Wird SPI1 in erythroiden Zellen überexprimiert, entstehen bei Mäusen Erythroleukämien (Moreau-Gachelin *et al.*, 1996). Ergebnisse verschiedener Gruppen weisen darauf hin, dass SPI1 und GATA1 physisch miteinander interagieren und jeweils antagonistisch auf den Interaktionspartner wirken (Nerlov *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Daraus entstand das Modell, dass SPI1 die Funktion von GATA1 blockiert und somit die erythroide Differenzierung unterdrückt (Rekhtman *et al.*, 2003). SPI1 ist ein Zielgen von RUNX1 während der embryonalen und adulten hämatopoetischen Entwicklung (Huang *et al.*, 2008).

RUNX1 ist ein weiterer essentieller Masterregulator der Hämatopoese. Dieser Transkriptionsfaktor wird in HSCs und allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der erythroiden Entwicklungslinie exprimiert. Hier nimmt die RUNX1-Expression mit zunehmender erythroider Differenzierung ab (North *et al.*, 2004). *RUNX1*<sup>-/-</sup> Mausembryos zeigen keine Hämatopoese in der embryonalen Leber und sterben an Tag 12,5 (Okuda *et al.*, 1996). Ohne RUNX1 können keine Stammzellen aus dem hämogenischen Endothelium gebildet werden, allerdings wird es in der weiteren Entwicklung nicht mehr zum Erhalt der HSCs benötigt (Chen *et al.*, 2009). In der adulten Hämatopoese wird RUNX1 für die korrekte Entwicklung von Megakaryozyten benötigt (Growney *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004). RUNX1 unterstützt die Megakaryopoese außerdem durch die Reprimierung der erythroiden Genexpression, indem es die Wirkung von KLF1 antagonisiert (Kuvardina *et al.*, 2015).

#### **2.1.10 Signalwege in der Hämatopoese**

Für eine funktionelle Hämatopoese spielen auch verschiedene Signalwege eine Rolle. Wichtige Signalwege sind dabei NOTCH, WNT und JAK / STAT. Ihnen allen ist gemein,

dass sie an vielen Vorgängen im eukaryotischen Organismus beteiligt und essentiell für die Hämatopoese sind. Ihre Deregulation ist häufig mit Leukämien assoziiert.

Die NOTCH-Rezeptoren und ihre Liganden werden in HSCs exprimiert (Singh *et al.*, 2000). Sie spielen sowohl eine Rolle für die Selbsterneuerung von HSCs als auch für deren Differenzierung und wirken direkt sowie indirekt über die Modulierung der Stammzellnische (Kushwah *et al.*, 2014). NOTCH ist außerdem mit hämatologischen Krankheiten assoziiert. Dabei kann NOTCH zur Entstehung von Leukämien beitragen oder den Krankheitsverlauf beschleunigen. So wird eine chromosomale Translokation von NOTCH, die zu dessen Aktivierung führt, mit der Pathogenese von T-ALL in Zusammenhang gebracht (Ellisen *et al.*, 1991; Weng *et al.*, 2004). Durch die Translokation besitzt NOTCH nicht mehr die zum proteasomalen Abbau benötigte Domäne, so dass es nicht mehr degradiert wird und aktiviert seinerseits das Protoonkogen *MYC* (Palomero *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2006). NOTCH kann allerdings auch zur Tumorsuppression beitragen (Alghisi *et al.*, 2013; Klinakis *et al.*, 2011; Zweidler-McKay *et al.*, 2005).

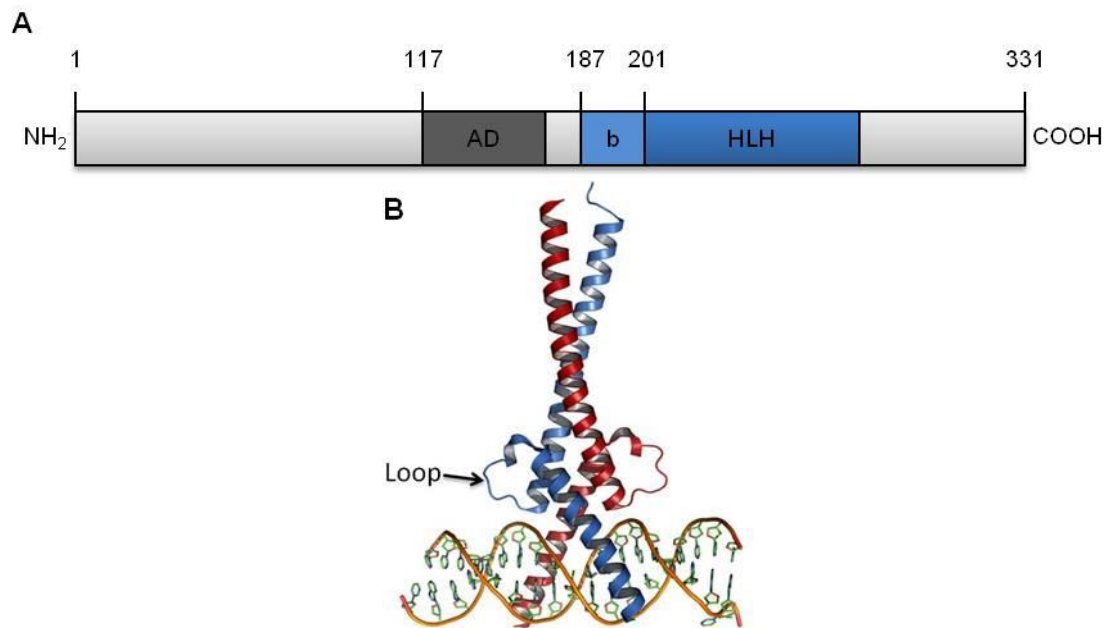
Der WNT-Signalweg ist essentiell an der Entwicklung beinahe jedes Organs beteiligt (Reya *et al.*, 2005). Während der Hämatopoese hat WNT eine Rolle bei der Selbsterneuerung von HSCs inne, die allerdings noch nicht eindeutig festgelegt ist. So führt ein konstitutiv aktivierter WNT-Signalweg zu einer Verbesserung der Proliferation und Repopulation von transplantierten HSCs in Mäusen (Reya *et al.*, 2003). In anderen Studien dagegen wird die Differenzierung blockiert und die HSC-Reservoirs sind schneller erschöpft (Kirstetter *et al.*, 2006; Scheller *et al.*, 2006). Aufgrund zahlreicher Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen schlagen Staal *et al.* ein Dosis-abhängiges Modell für die Effekte von WNT auf die HSC-Aktivität vor (2016). Der WNT-Signalweg ist außerdem mit dem NOTCH-Signalweg verbunden (Collu *et al.*, 2014).

Während der Signalübertragung des JAK / STAT-Signalweges aktivieren *Janus protein tyrosine kinases* (JAKs) Transkriptionsfaktoren der Gruppe *signal transducers and activators of transcription* (STATs). Sie verarbeiten von Zytokinen ausgelöste Signale zu einer zellspezifischen Antwort durch die Aktivierung des entsprechenden Expressionsprogrammes (Rane *et al.*, 2002). Für die Hämatopoese ist besonders STAT5 wichtig, da dieser Transkriptionsfaktor pleiotrope Effekte an verschiedenen Punkten der Hämatopoese ausübt, wie den HSCs, MPPs und ausgereiften hämatopoetischen Zellen. STAT5 wird z.B. durch IL3, EPO / SCF, TPO, G-CSF und GM-CSF aktiviert (Wang *et al.*, 2013b).

## **2.2 Das *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1***

Der Transkriptionsfaktor *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* (TAL1) wurde zuerst im Zusammenhang mit einer chromosomalen Translokation in einer akuten lymphatischen

---



**Abbildung 2.7: (A) Struktur von TAL1 und (B) Modell des TAL1-E47-Heterodimers während der DNA-Bindung im Bereich des bHLH-Motives.** Das Protein besteht aus 331 Aminosäuren und weist eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AD) auf. Die *basic*-Region (b) vermittelt DNA-Bindung, während die *helix-loop-helix*-Region (bHLH) für die Bildung von Dimeren mit anderen bHLH-Proteinen notwendig ist (Heterodimer-Modell modifiziert nach El Omari *et al.*, 2013).

T-Zell-Leukämie (T-ALL) entdeckt (Finger *et al.*, 1989). Das Gen *TAL1* ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und umfasst mit einer Länge von 16 kb acht Exons, von denen jedoch nur drei codierend sind (Aplan *et al.*, 1990a; Begley *et al.*, 1991). Seine ektope Expression in T-Zellen ist eng mit T-ALL assoziiert, deren Merkmal die übermäßige Produktion unreifer lymphatischer Blasten ist (Francois *et al.*, 1998; Goldfarb *et al.*, 1994; Kikuchi *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 2014). Das regulatorische Potential von TAL1 spiegelt auch dessen zentrale Rolle in der Hämatopoese wieder, in welcher dieser Transkriptionsfaktor als ein Masterregulator fungiert. Zur Induktion der embryonalen Hämatopoese wird TAL1 benötigt, ebenso wie zur erythroid-megakaryozytären Differenzierung (Elwood *et al.*, 1998; Robb *et al.*, 1995).

### 2.2.1 Struktur und *basic-helix-loop-helix*-Motiv von TAL1

Das Volllänge-Protein TAL1 besteht aus 331 Aminosäuren, was der 42 kDa-Form entspricht. Durch alternative Translationsinitiation können drei N-terminal verkürzte Isoformen gebildet werden, die jedoch alle noch das *basic-helix-loop-helix* Motiv (bHLH) aufweisen (Calkhoven *et al.*, 2003). Neben dem Volllänge-Protein ist die 22 kDa-Form am häufigsten und mit erythroider Differenzierung assoziiert (Elwood *et al.*, 1994).

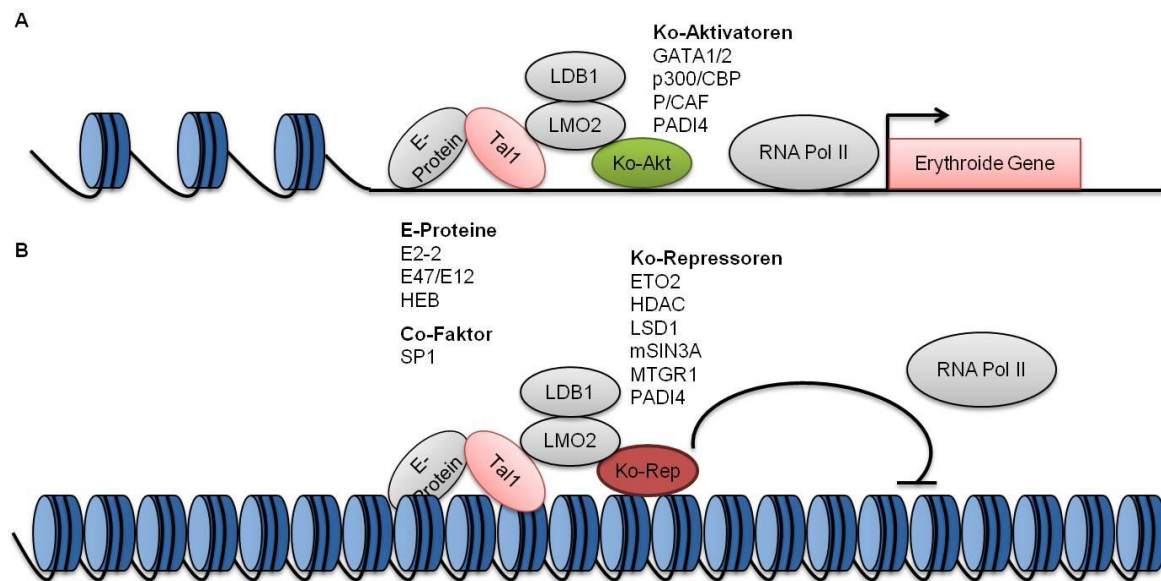
TAL1 ist ein bHLH -Protein der Klasse II, welche, im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden bHLH-Proteinen der Klasse I (auch E-Proteine genannt), gewebespezifisch sind (Chen *et al.*, 1990a; 1990b; Murre *et al.*, 1994; 1989a; 1989b). Aktiviert wird TAL1 über die Aktivierungsdomäne (AD) im N-Terminus durch die Phosphorylierung von Serin 122 (Aplan *et al.*, 1997; Wadman *et al.*, 1994). Die namensgebende Struktur der bHLH-Proteine besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices (H), die über eine flexible Schleife (*loop*; L) miteinander verknüpft sind, sowie einer *basic*-Region (b) (Ferre-D'Amare *et al.*, 1993). Die Aminosäurereste im HLH-Motiv vermitteln die Dimerisierung mit anderen bHLH-Proteinen (Davis *et al.*, 1990; Murre *et al.*, 1989b; Shirakata *et al.*, 1993; Voronova *et al.*, 1990). Über die positiv geladene *basic*-Region wird DNA am Konsensusmotiv „CANNTG“ (E-Box) gebunden (Aronheim *et al.*, 1991). In der *basic*-Region befindet sich außerdem ein Motiv, dass die nukleare Lokalisation von TAL1 vermittelt (siehe Abbildung 2.7A; Goldfarb *et al.*, 1992).

Die E-Box wird jeweils zur Hälfte von jedem Monomer eines E47:TAL1 Heterodimers erkannt (siehe Abbildung 2.7B; Massari *et al.*, 2000). Dabei wurde für TAL1 gezeigt, dass es auch ohne eigene funktionale DNA-Bindung aktiv ist, da die DNA-Bindung vom Heterodimerisierungspartner vermutlich ausreichend ist (Porcher *et al.*, 1999). Die zusätzliche Bindung von LMO2 durch das E47:TAL1 Heterodimer verstärkt die Dimerbindung durch die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken und ermöglicht die Bindung von weiteren Ko-Faktoren durch den TAL1-Proteinkomplex (El Omari *et al.*, 2013).

### 2.2.2 TAL1-Interaktionspartner

Die Wirkung eines Transkriptionsfaktors wie TAL1 ist nicht von diesem allein abhängig, sondern wird erst durch die Interaktion mit anderen Faktoren entwickelt, wie sie z.B. innerhalb eines Multiproteinkomplexes vorhanden sind (Kerenyi *et al.*, 2010; Latchman, 1993) Die bHLH-Proteine der Klasse II, zu denen TAL1 gehört, sind nur im Heterodimer mit einem E-Protein funktional, können dann aber sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren der Transkription fungieren. Die ubiquitär vorkommenden E-Proteine sind auch im Homodimer funktional und wirken dann als Transkriptionsaktivatoren (Kee, 2009). Zu den vier E-Proteinen, die alle auch mit TAL1 interagieren, gehören E47, E12, E2-2 und HEB (Hsu *et al.*, 1991; 1994; Murre *et al.*, 1994). Die E-Proteine E47 und E12 entstehen durch unterschiedliche Spleißvarianten des *E2A*-Gens (Kee, 2009).

Von der Bindung weiterer Ko-Faktoren ist abhängig, ob TAL1 als Aktivator oder als Repressor auf die Transkription von Zielgenen wirkt. Die Multiproteinkomplexe werden von TAL1 an Promotorsequenzen rekrutiert. Das TAL1 / E-Protein-Heterodimer bindet über das Adapterprotein LMO2 auch dessen Interaktionspartner LDB1 und bildet so einen Kernkomplex (Lecuyer *et al.*, 2004). Bioinformatische genomweite Analysen ergaben,



**Abbildung 2.8: TAL1 kann sowohl als (A) Aktivator als auch als (B) Repressor hämatopoetischer Genexpression fungieren.** TAL1 ist nur mit einem E-Protein im obligaten Heterodimer aktiv und kann die Rekrutierung der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) an Promotoren steuern. Das Heterodimer bindet über das Adapterprotein LMO2 dessen Interaktionspartner LDB1. Dieser Kernkomplex ist mit Genaktivierung assoziiert, kann aber zusätzlich noch Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren binden. Wird GATA1 oder GATA2 vom Kernkomplex gebunden, spricht man vom pentamerischen Komplex, der eine wichtige Rolle in der Aktivierung erythroider Gene inne hat. Der Ko-Faktor SP1 kann die DNA-Bindung des Komplexes vermitteln (modifiziert nach Kerényi *et al.*, 2010).

dass dieser Multiproteinkomplex die Transkription hämatopoetischer Gene aktivieren kann (Kerényi *et al.*, 2010). Durch die Bindung weiterer Faktoren spezifiziert sich die Wirkung. Wird GATA1 bzw. GATA2 durch den Kernkomplex gebunden, entsteht der sogenannte pentamerische Komplex in hämatopoetischen Zellen (siehe Abbildung 2.8). Der pentamerische Komplex kann über SP1 an die DNA binden. Der Promotor des SCF-Liganden c-KIT wird von Mitgliedern des pentamerischen Komplexes besetzt und die Expression von c-KIT hängt vom Vorhandensein aller Proteine des pentamerischen Komplexes ab. Der Verlust von TAL1 während der hämatopoetischen Differenzierung führt vermutlich zur Inaktivierung des pentamerischen Komplexes (Lecuyer *et al.*, 2002). Der Kernkomplex kann auch die Ko-Repressoren ETO2 und MTGR1 rekrutieren (siehe Abbildung 2.8; Fujiwara *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2010; Tripic *et al.*, 2009). Dies ist für die erythroide Differenzierung relevant, da durch die Verminderung von ETO2 und MTGR1 während der erythroiden Differenzierung die Expression erythroider Gene stattfinden kann (Cai *et al.*, 2009; Fujiwara *et al.*, 2013). Außerdem können vom Kernkomplex neben dem Ko-Faktor mSIN3A noch die chromatinremodulierenden Enzyme P/CAF, p300 und LSD1 rekrutiert werden (Huang *et al.*, 1999; 2000a; 2000b; Li *et al.*, 2012). Ein weiterer Ko-



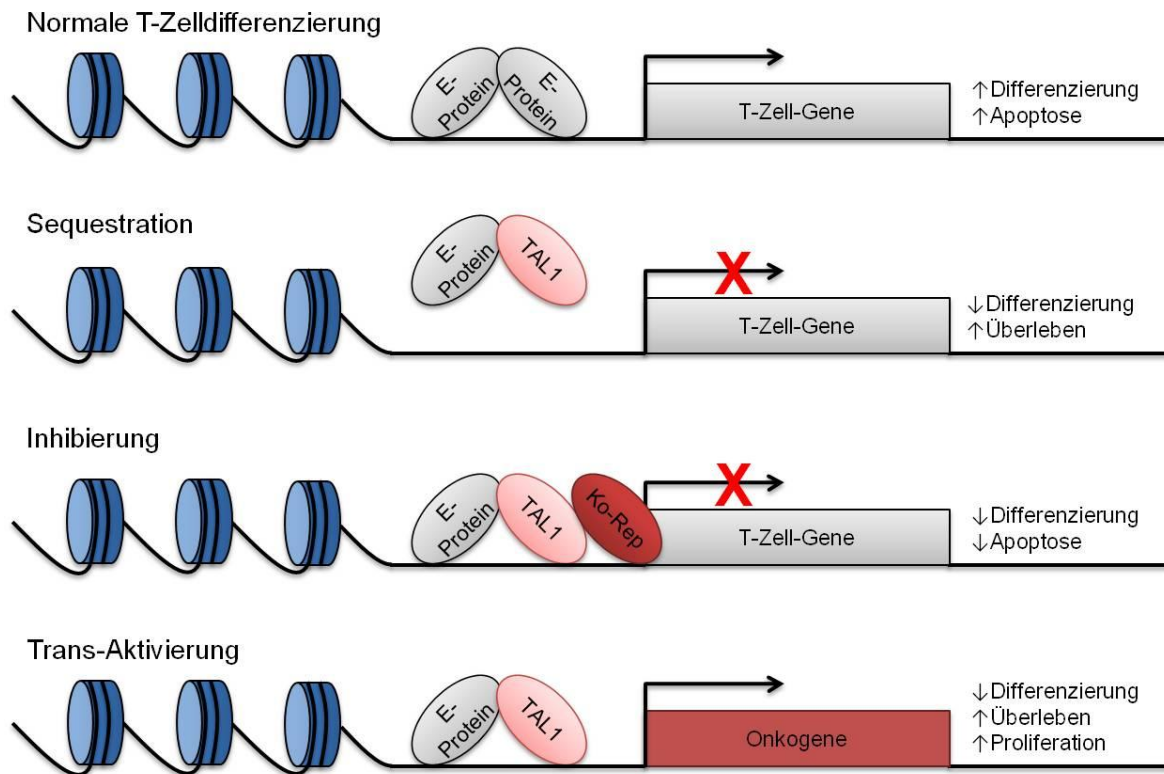
Faktor von TAL1 ist die Peptidylarginin Deiminase IV (PADI4). PADI4 wirkt epigenetisch über die Modulation von Histonmodifikationen. Dabei kann PADI4 sowohl als Ko-Aktivator als auch als Ko-Repressor fungieren. PADI4 wird über das TAL1-Heterodimer an das Chromatin rekrutiert und kann am *IL6ST* Gen inhibierenden Histonmodifikationen entgegenwirken und aktive Histonmodifikationen fördern, so dass die Genexpression aktiviert werden kann. Auf dem Promotor von *CTCF* wirkt durch den TAL1-Komplex rekrutiertes PADI4 als Repressor, indem reprimierende Histonmodifikationen unterstützt und aktivierende verhindert werden (siehe Abbildung 2.8; Kolodziej *et al.*, 2014).

### **2.2.3 TAL1 in der Hämatopoese**

TAL1 ist ein Masterregulator der Hämatopoese mit einer essentiellen Rolle schon während der embryonalen Hämatopoese. Homozygote *Tal1*<sup>-</sup> Mausembryos sterben an Tag 9,5, ohne dass im Dottersack hämatopoetische Aktivität nachgewiesen werden kann (Robb *et al.*, 1995). Auch murine embryonale Stammzellen (ES Zellen) mit dem Genotyp *Tal1*<sup>-</sup> / *Tal1*<sup>-</sup> zeigen nur stark eingeschränkte Bildung von hämatopoetischen Kolonien. In diesen ES Zellen werden außerdem Gata1, Klf1, Spi1 und Globin Gene nicht exprimiert (Robertson *et al.*, 2000). Diese Gene sind somit von Tal1 abhängig. Neben seiner Rolle in der embryonalen Hämatopoese wird TAL1 in der definitiven Hämatopoese für die Selbsterneuerung von HSCs benötigt (Rojas-Sutterlin *et al.*, 2014). Außerdem wird TAL1 in MPPs und der erythroiden -, megakaryozytären - und Mastzell-Entwicklungslinie exprimiert. Für die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung ist TAL1 essentiell, während dessen Funktion in den Mastzellen noch nicht abschließend geklärt ist (Lecuyer *et al.*, 2004). Die TAL1 Expression in erythroiden -, megakaryozytären – und Mastzellen weist starke Parallelen zur GATA1 Expression auf (Cantor *et al.*, 2002). Auch das gemeinsame Auftretens der TAL1- und GATA1-Bindestellen auf Genloci weist auf eine häufige Ko-Regulation durch TAL1 und GATA1 hin (Kerenyi *et al.*, 2010).

### **2.2.4 TAL1 in der akuten lymphatischen T-Zelleukämie**

Die akute lymphatische T-Zelleukämie (T-ALL) macht 15 % bzw. 25 % aller akuten lymphatischen Leukämien (ALL) in pädiatrischen bzw. adulten Kohorten aus (Pui *et al.*, 2004). Durch einen Block in der Differenzierung proliferieren T-Zellvorläufer unkontrolliert im Knochenmark und führen so zu einer insuffizienten Hämatopoese. Dies und die Infiltration der Organe mit den dysfunktionalen T-Zellvorläufern führt zu den klinischen Symptomen Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie.



**Abbildung 2.9: Modell von TAL1 in der Leukemogenese der akuten lymphatischen T-Zellleukämie (T-ALL).** E-Protein-Dimere steuern Gene in der T-Zelldifferenzierung. Durch die Mechanismen der Sequestration, Inhibierung und Trans-Aktivierung können T-Zellen transformiert werden. Eine aberrante Expression von TAL1 führt dazu, dass sich TAL1 / E-Protein-Heterodimere bilden. Somit steht das sequestrierte E-Protein nicht mehr zur Aktivierung der T-Zell-Gene zur Verfügung. Außerdem können die Heterodimere durch die Rekrutierung von Ko-Repressoren die Expression von T-Zell-Genen inhibieren. Zusätzlich werden durch die Heterodimere Onkogene aktiviert, so dass insgesamt die Differenzierung abnimmt und das Überlebenspotential der transformierten Zellen ansteigt (modifiziert nach O'Neil *et al.*, 2004; Palomero *et al.*, 2006b).

Ursache für die unkontrollierte Proliferation können genetische Aberrationen sein, welche Differenzierungsstörungen, eine erhöhte Proliferationsrate oder verminderte Apoptose zur Folge haben (Litzow *et al.*, 2015). Lange wurde die aberrante Expression von TAL1 als ausreichende Ursache für T-ALL angesehen. Nachdem jedoch in einigen Studien gezeigt wurde, dass die Aktivierung von TAL1 alleine nur geringe onkogene Effekte zeigt, geht man mittlerweile davon aus, dass zur malignen Entartung lymphatischer Vorläuferzellen mehr als eine Aberration notwendig ist. TAL1 prägt in Kollaboration mit anderen Onkogenen, wie z.B. LMO1, LMO2, P53, v-ABL oder N-RAS sehr aggressive T-Zelltumore aus (Lecuyer *et al.*, 2004).

In etwa 40 % der Fälle von T-ALL wird TAL1, das in der normalen T-Zell-Differenzierung herab reguliert wird, ungewöhnlich stark exprimiert (Armstrong *et al.*, 2005; Bash *et al.*,

1995; Ferrando *et al.*, 2002; 2004). Zur Aktivierung von *TAL1* können Translokationen, interstitielle Deletionen, Mutationen oder bisher unbekannte Mechanismen führen (Bash *et al.*, 1995). Ein Beispiel für eine häufige Deletion, die in bis zu 26 % der T-ALL Fälle vorkommt, ist das *SIL / TAL1*-Fusionsgen (Aplan *et al.*, 1990b; Brown *et al.*, 1990). Durch eine submikroskopische Deletion wird der codierende Bereich des *SIL*-Gens und der *TAL1*-Promotor deletiert. Die Fusion aus dem *SIL*-Promotor, der ubiquitär in proliferierenden Zellen aktiv ist, und dem codierenden Bereich von *TAL1* führt zu einer ektopten Expression von *TAL1* (Aplan *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1990b). *TAL1* liegt nun stark vermehrt vor, weshalb auch verstärkt E-Proteine durch *TAL1* sequestriert werden. Diese stehen dann nicht mehr zur Verfügung, um Differenzierungs- und Apoptosegene durch die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren wie p300 zu aktivieren. Die *TAL1 / E*-Protein-Heterodimere rekrutieren nun ihrerseits Ko-Repressoren, so dass die Expression von Differenzierungsgenen inhibiert wird (O'Neil *et al.*, 2004; 2007). Eine weitere Möglichkeit der Leukämieinduktion durch *TAL1* besteht in der ektopten Trans-Aktivierung von Onkogenen durch das *TAL1 / E*-Protein-Heterodimer in Kooperation mit LMO1 bzw. LMO2 (siehe Abbildung 2.9; Palomero *et al.*, 2006b). Patienten, deren T-ALL mit der Aktivierung von *TAL1* assoziiert ist, sprechen schlechter auf Therapien an, als Patienten, deren T-ALL durch andere Onkogene wie *HOX11* oder *MLL-ENL* ausgelöst wird, ohne dass die genauen Ursachen dafür bekannt sind (Ferrando *et al.*, 2002). Die weitere Aufklärung der Mechanismen von *TAL1* in T-ALL trägt daher nicht nur zum besseren Verständnis der Leukemogenese bei, sondern kann auch helfen, Therapiemöglichkeiten zu verbessern.

### **2.2.5 Zielgene von *TAL1***

Da *TAL1* vor allem in HSCs und der erythroid-megakaryozytären Differenzierung eine Funktion inne hat, wurden Studien zu Zielgenen von *TAL1* häufig in hämatopoetischen Vorläuferzellen und erythroiden Zellen durchgeführt. Oftmals reguliert *TAL1* die gleichen Gene in HSCs und erythroiden Zellen, was die konservierte Rolle von *TAL1* aufzeigt (Wilson *et al.*, 2009). *TAL1* reguliert vor allem Gene mit Schlüsselfunktionen in der hämatopoetischen Differenzierung. Interessanterweise wurde für *TAL1* eine positive Autoregulation in der terminalen erythroiden Differenzierung gezeigt (Kassouf *et al.*, 2008). Daneben reguliert *TAL1* auch alle Komponenten des pentamerischen Komplexes. Wichtige Zielgene sind hier besonders die Rezeptoren *c-KIT* und *EPOR*, ebenso wie die für die Erythropoese essentiellen Gene *GYP A* und *KLF1*. Auch der Masterregulator der Megakaryopoese *RUNX1* ist ein Zielgen von *TAL1*. Weitere Zielgene von *TAL1* sind mit vaskulären Endothelzellen, Osteoklasten und Signaltransduktion assoziiert (siehe Tabelle 2.1). Sowohl der Einfluss auf entscheidende Akteure der Hämatopoese als auch die Bandbreite der regulierten Gene machen die Relevanz von *TAL1* deutlich.

**Tabelle 2.1: Übersicht wichtiger Zielgene von TAL1.** m – murin; HUVEC - *human umbilical vein endothelial cells*; HSC – hämatopoetische Stammzellen, SAOS - *sarcoma osteogenic cells*; HSPC – hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen; MEL – murine erythroleukämische Zellen; HEL – humane erythroleukämische Zellen; T-ALL – Akute lymphatische T-Zellleukämie.

Gen	Funktion	Zellen	Referenz
<i>ANGPT2</i>	Antagonist von ANGPT1, der endotheliale Apoptose induziert	HUVEC	Deleuze <i>et al.</i> (2012)
<i>CDH5</i>	Zell-Zell-Adhäsionsmolekül des vaskulären Endotheliums	HUVEC	Deleuze <i>et al.</i> (2007)
<i>CD41</i>	Bestandteil des Integrinrezeptors zur Thrombozytenaggregation	mESC	Mikkola <i>et al.</i> (2003)
<i>c-KIT</i>	SCF-Rezeptor	TF1, HSC, SAOS	Krosi <i>et al.</i> (1998) Lecuyer <i>et al.</i> (2002) Vitelli <i>et al.</i> (2000)
<i>DC-STAMP</i>	Masterregulator der Osteoklasten-Zellfusion	murine Osteoklasten	Courtial <i>et al.</i> (2012)
<i>DDIT4</i>	Assoziiert mit DNA-Beschädigung	HSPC	Benyoucef <i>et al.</i> (2015)
<i>E2A</i>	bHLH-Protein der Klasse I	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>EPOR</i>	EPO-Rezeptor	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010) Rogers <i>et al.</i> (2012)
<i>EPB42</i>	Protein der Erythrozytenmembran	MEL	Xu <i>et al.</i> (2003)
<i>GATA1</i>	Masterregulator der Erythropoese		Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>GYPA</i>	Bestandteil der Erythrozytenmembran	HSC	Lahlil <i>et al.</i> (2004)
<i>HBA</i>	Bestandteil des Hämoglobins	HSC, erythroide Vorläufer, Erythrozyten	Anguita <i>et al.</i> (2004)
<i>HBB</i>	Bestandteil des Hämoglobins	K562, MEL	(Song <i>et al.</i> , 2007)
<i>IL6ST</i>	Teil des Zytokin-Rezeptorkomplexes	HEL	Kolodziej <i>et al.</i> (2014)
<i>KLF1</i>	Hämatopoetischer Transkriptionsfaktor (Erythropoese)	HSPC	Kuwardina <i>et al.</i> (2015)
<i>LDB1</i>	Interaktionspartner von LMO2 im pentamerischen Komplex	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>LMO2</i>	Adapterprotein des pentamerischen Komplex	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>MEF2C</i>	Enhancer in der Myogenese	fetale Vorläuferzellen (Leber)	Gekas <i>et al.</i> (2009)
<i>MYCN</i>	bHLH-Protein, das mit verschiedenen Tumoren assoziiert ist	T-ALL-Zellen	Astolfi <i>et al.</i> (2014)
<i>NFKB1</i>	Bestandteil des NF-kappa-B-Proteinkomplexes, der Transkription aktiviert	T-ALL-Zellen	Chang <i>et al.</i> (2006)
<i>RUNX1</i>	Masterregulator der Megakaryopoese	Zellen des Dottersacks	Landry <i>et al.</i> (2008)
<i>SPI1</i>	Transkriptionsfaktor der myeloiden und B-Zell-Differenzierung	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>TAL1</i>	Masterregulator der Hämatopoese	primäre erythroide Vorläuferzellen	Kassouf <i>et al.</i> (2010)
<i>UBE2H</i>	Ubiquitin-Konjugase	K562, HSPC	Lausen <i>et al.</i> (2010)

## 2.3 Das Fuse binding protein 1

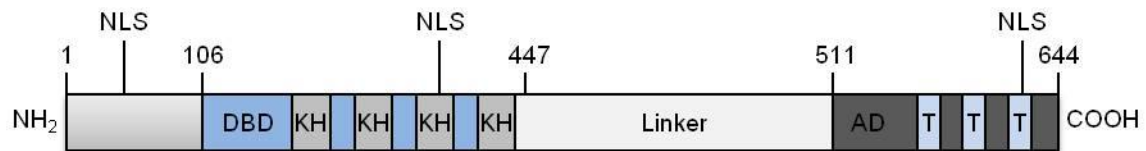
Die Entdeckung des *fuse binding protein 1* (FUBP1) erfolgte in seiner Funktion als transkriptioneller Regulator des *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (MYC, oft auch *c-MYC* benannt) in undifferenzierten Zellen (Avigan *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 1994). *FUBP1* liegt auf dem humanen Chromosom 1 und erstreckt sich mit 25 Exons über 35 kb (NM\_003902.3). Während der Entwicklung von Organen wie Lunge und Nervensystem übernimmt es eine wichtige Rolle (Kim *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2000). Die aberrante Expression bzw. Mutation von *FUBP1* ist in verschiedenen malignen Geweben zu finden, wie z.B. in Oligodendrogliomen und Leberkrebs (Bettegowda *et al.*, 2011; Malz *et al.*, 2009; Rabenhorst *et al.*, 2009). In seiner Rolle als RNA-bindendes Protein trägt FUBP1 außerdem zu viralen Erkrankungen wie Hepatitis C und der Hand-Fuß-Mund-Krankheit bei (Dixit *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013). FUBP1 ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt und Teil eines komplexen Netzwerkes zur transkriptionellen Regulation. Somit ist FUBP1 ein sehr diverses Protein mit weitreichenden Funktionen.

### 2.3.1 Struktur von FUBP1

FUBP1 besteht aus 644 Aminosäuren und weist drei distinkte Domänen auf (siehe Abbildung 2.10). Die N-terminal lokalisierte Domäne mit einer amphipatischen Helix inhibiert die C-terminal gelegene Trans-Aktivierungsdomäne, welche drei tyrosinreiche Motive (YM) aufweist (Duncan *et al.*, 1996). Diese YM-Motive erleichtern die Interaktion von FUBP1 mit dem basalen Transkriptionsfaktor GTF2H (Liu *et al.*, 2000). Eine zentrale Domäne vermittelt mit ihren vier KH-Motiven die Bindung von Nukleinsäuren. Neben RNA wird auch das *far upstream element* (FUSE) Motiv als einzelsträngige DNA (ssDNA, engl. *single stranded DNA*) gebunden (Braddock *et al.*, 2002a; He *et al.*, 2000a; Valverde *et al.*, 2008). Außerdem befinden sich im C-Terminus Arginin-Glycin-Glycin (RGG) Motive, welche mit der ATP-abhängigen 3'-5'-Helikaseaktivität von FUBP1 assoziiert sind (Costa *et al.*, 1999; Tuteja *et al.*, 1993; Vindigni *et al.*, 2001). Zur nuklearen Lokalisation weist FUBP1 mehrere Nuklearlokalisierungssignale (NLS) auf (He *et al.*, 2000b).

### 2.3.2 FUSE binding protein Familie

Das Protein FUBP1 ist in Säugetieren mit über 90 % Homologie hoch konserviert. Durch die Überprüfung einer cDNA-Bibliothek aus humanen Muskelzellen wurden zwei weitere Homologe von FUBP1 entdeckt: FUBP2 und FUBP3. Außerdem wurde ein viertes Homolog in *Caenorhabditis elegans* gefunden, dass ebenfalls der FUBP-Familie zugeordnet wird. Die drei Mitglieder der mammalen FUBP-Familie sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich und auch strukturell konserviert. Zusätzlich zeigen sie in einigen getesteten Zelllinien ein ähnliches Expressionsmuster (Davis-Smyth *et al.*, 1996). Allerdings wird FUBP2 außer in Herz und Nieren eher gering exprimiert. FUBP1 und FUBP3 zeigen



**Abbildung 2.10: Struktur von FUBP1.** Das Protein besteht aus 644 Aminosäuren. Die N-terminale Domäne wird mit Inhibition in Verbindung gebracht. Benachbart dazu ist die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die vier KH-Motive (KH) aufweist. Diese beiden Bereiche sind über eine *Linker*-Domäne (Linker) mit der C-terminalen Trans-Aktivierungsdomäne (AD) verknüpft. Diese Domäne verfügt außerdem über drei Tyrosin-reiche Motive (T). Über das gesamte Protein verteilt befinden sich zur Kernlokalisierung mehrere Nuklearlokalisierungssignale (NLS; modifiziert nach Zhang *et al.*, 2013).

nahezu das gleiche Expressionsmuster. Dabei wird FUBP1 jedoch vor allem im fetalen Gehirn exprimiert, während die Expression von FUBP3 im adulten Hirn sehr hoch ist. Das am besten beschriebene FUBP-Familienmitglied ist FUBP1. Es ist vor allem für seine DNA-Bindung in Zusammenhang mit der Aktivierung der *MYC*-Transkription bekannt (Zhang *et al.*, 2013). Außerdem konnte bisher nur für FUBP1 die Helikaseaktivität nachgewiesen werden, obwohl das RGG-Motiv bei allen Familienmitgliedern vorliegt (Vindigni *et al.*, 2001).

### 2.3.3 FUBP1 als RNA bindendes Protein

Das KH-Motiv, das FUBP1 mit allen FUBP-Familienmitgliedern teilt, ist in der Lage, RNA-Bindung zu vermitteln (Valverde *et al.*, 2008). Für FUBP1 wurde die Bindung an verschiedene zelluläre mRNAs und virale RNAs gezeigt. Dabei erfüllt die Bindung durch FUBP1 sehr verschiedene, teilweise auch gegensätzliche Funktionen: mRNA-Degradation, positive *Splicing*-Regulation, gesteigerte bzw. inhibierte Translation und die Unterdrückung bzw. Steigerung viraler Proteintranslation / Replikation (Zhang *et al.*, 2013). Eine Übersicht der Ziele und Effekte von FUBP1 ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

**Tabelle 2.2: Übersicht über Ziele von FUBP1 als RNA-bindendes Protein.** FUBP1 bindet an zelluläre mRNA und virale RNA und übt dadurch sehr unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Funktionen aus. EV - Enterovirus; HCV - Hepatitis C Virus; IRES - Interne ribosomale Eintrittsstelle; JEV - Japanisches Enzephalitis Virus; MEF - embryonische Maus-Fibroblasten, *mouse embryonic fibroblasts*; UTR - untranslatierte Region.

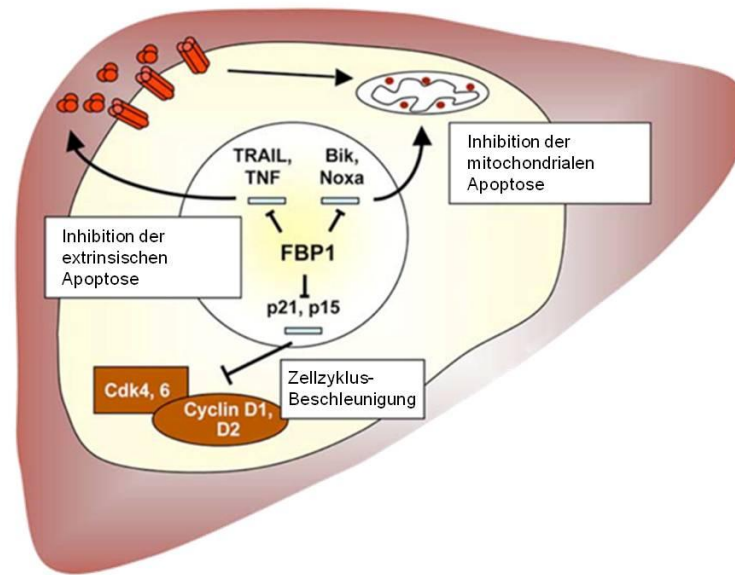
Ziel	Bindung	Funktion	Experimentelles Modell	Referenz
<i>DMD</i>	Exon 39	Positiver <i>Splicing</i> Regulator	C25cl48-Zellen	(Miro <i>et al.</i> , 2015)
EV71	IRES in 5'-UTR	Förderung Translation / viraler Replikation	SK-N-MC -, SF268 -, RD -, Vero-Zellen	(Huang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Gap43</i>	3'-UTR	GAP34 mRNA Degradation	Rattengehirn	(Irwin <i>et al.</i> , 1997)
HCV	3'-UTR	Förderung viraler Replikation	MH14 Zellen	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
JEV	5'-UTR	Unterdrückung Translation / viraler Replikation	HeLa -, NT2-Zellen	(Chien <i>et al.</i> , 2011)
<i>MDM2</i>	Intron 11	Positiver <i>Splicing</i> Regulator	HeLa -, MCF7 Zellen	(Jacob <i>et al.</i> , 2014)
<i>Npm1</i>	3'-UTR	Inhibition Translation	Tsc <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup> MEFs	(Olanich <i>et al.</i> , 2011)
<i>P27</i>	IRES in 5'-UTR	Verstärkung Translation	MCF7-Zellen	(Zheng <i>et al.</i> , 2011)
<i>PKD2</i>	3'-UTR	Inhibition Translation	HeLa -, HEK293-Zellen	(Zheng <i>et al.</i> , 2016)
<i>PTGS2</i>	3'-UTR	nicht bekannt	HeLa-Zellen	(Dean <i>et al.</i> , 2004; Thiede <i>et al.</i> , 2001)

### 2.3.4 Einfluss von FUBP1 auf zelluläre Prozesse und Karzinogenese

Neben seiner Funktion als RNA-bindendes Protein reguliert FUBP1 auch zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Zellmigration und Proliferation. Außerdem ist FUBP1 an der Entstehung von Metastasen beteiligt (Zhang *et al.*, 2013). Genau diese zellulären Prozesse sind eng mit den Kennzeichen der Karzinogenese verbunden. Diese Kennzeichen umfassen die sechs biologischen Fähigkeiten der Erhaltung von Wachstumssignalen, Insensitivität gegenüber wachstumsunterdrückenden Signalen, Resistenz gegen Apoptose, Aktivierung von Invasion / Metastasen, Befähigung zur replikativen Immortalität und Induktion von Angiogenese (Hanahan *et al.*, 2011).

Auf die Apoptose hat FUBP1 eine inhibierende Wirkung, abhängig von seiner zellulären Lokalisation. In apoptotischen Zellen findet sich FUBP1 im Zytoplasma, während der Verbleib von FUBP1 im Nukleus mit der Apoptoseinhibition assoziiert ist. Die Apoptose von Darmkrebszellen wird bei einer Überexpression von FUBP1 unterdrückt (Rabenhorst *et al.*, 2009). In einer Brustkrebszelllinie, welche ektopisch eine FUBP1-Mutante exprimiert, die nicht im Zytoplasma lokalisiert ist, wird die Apoptose ebenfalls vermindert (Jang *et al.*, 2009). Umgekehrt wird die Apoptose von Leberkrebszellen mit einem FUBP1 *knock down* nach apoptoseinduzierenden Stimuli verstärkt (Rabenhorst *et al.*, 2009).

Einen großen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt FUBP1 über die Regulation des *MYC*-Gens, dessen Produkt ein Masterregulator der Zellproliferation ist (de Nigris *et al.*, 2003;



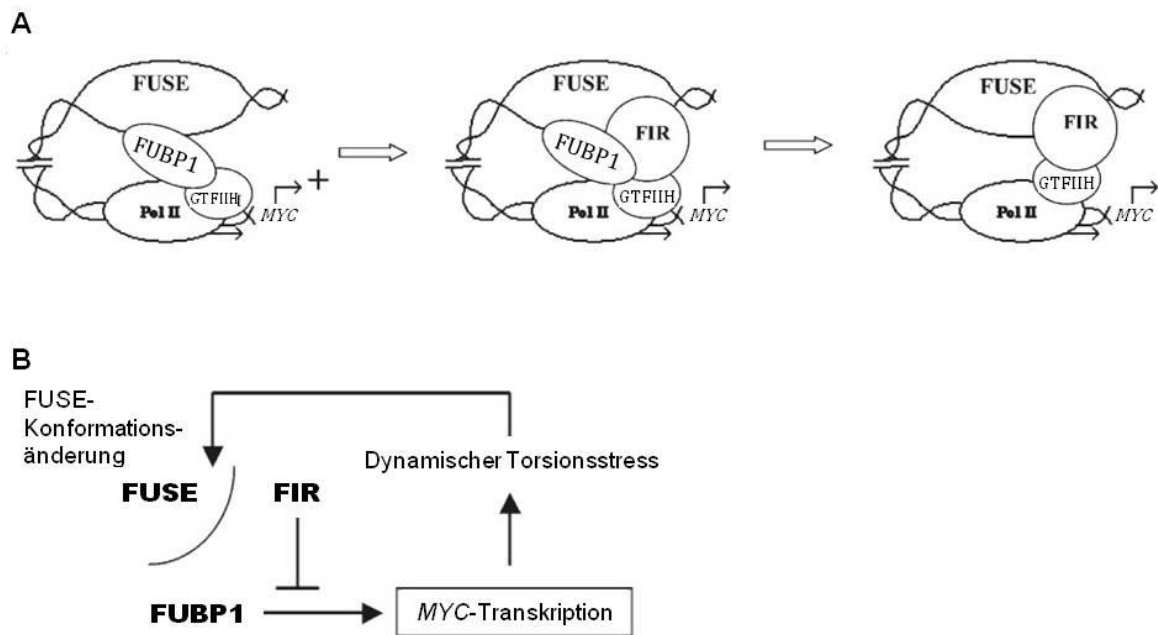
**Abbildung 2.11: Die Rolle von FUBP1 in der Entstehung von Leberkrebs.** In Leberzellen tragen die multiplen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Signale von FUBP1 zur Transformation bei. Zum Einen inhibiert FUBP1 (FBP1) die Zellzyklusinhibitoren P15 und P21, sodass die von ihnen reprimierten aktivierenden Zellzyklusregulatoren CCND1, CCND2, CDK4 und CDK6 den Zellzyklus beschleunigen können. Weiterhin hat die Inhibition der Apoptose-vermittelnden Proteine TRAIL; TNF, BIK und NOXA durch FUBP1 eine Apoptose-Resistenz der Zellen zur Folge (modifiziert nach Rabenhorst *et al.*, 2009).

Levens, 2002; Morrish *et al.*, 2009). Rabenhorst *et al.* haben die Rolle von FUBP1 in der Entstehung von Leberkrebs untersucht, wobei der weitreichende Einfluss von FUBP1 auf Zellzyklus und Apoptose deutlich wurde (2009). So ist FUBP1 ein potenter Repressor der Zellzyklusinhibitoren P15 und P21. Konsistent damit werden die durch P21 und P15 reprimierten aktivierenden Zellzyklusregulatoren CCND1, CCND2, CDK4 und CDK6 durch FUBP1 positiv reguliert. Eine inhibitorische Funktion auf die extrinsische Apoptose übt FUBP1 über die negative Regulation von TRAIL und TNF aus. Durch die ebenfalls negative Regulation von BIK und NOXA durch FUBP1 wird der mitochondriale Apoptose-Signalweg inhibiert (siehe Abbildung 2.11). Die multiplen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Signale tragen somit zum onkogenen Potential von FUBP1 bei, das sich auch in der erhöhten FUBP1-Expression in verschiedenen Tumorgeweben zeigt (Zhang *et al.*, 2013).

### 2.3.5 FUBP1 als transkriptioneller Regulator von MYC

Eines der wichtigsten Zielgene von FUBP1 ist *MYC*, da es sich bei diesem Proto-Onkogen um einen Masterregulator der Zellproliferation handelt (Levens, 2002). FUBP1 reguliert *MYC* über die AT-reiche FUSE-Sequenz, die sich 1,5 kb stromaufwärts des





**Abbildung 2.12: Modell für die Regulation von *MYC* durch FUSE, FUBP1 und FIR. (A)** Schrittweise Formierung des Komplexes aus FUSE, FUBP1 und FIR zur Regulation der Transkription von *MYC*. Im ersten Schritt erlaubt die Aufschmelzung der FUSE-Sequenz die Rekrutierung von FUBP1 zur Aktivierung von *MYC*. Die C-terminale Domäne von FUBP1 interagiert dabei mit GTFIIH, wodurch die Helikase-Aktivität von FUBP1 erhöht wird. Im nächsten Schritt wird FIR in den Komplex integriert, wodurch die Aktivität von FUBP1 reprimiert wird und die Expression von *MYC* wieder auf das basale Niveau sinkt, wobei FIR ebenfalls direkt mit GTFIIH interagiert. Im letzten Schritt wird FUBP1 aus dem Komplex verdrängt, während FIR noch längere Zeit gebunden bleibt. **(B)** Schematische Darstellung des Modells zur Regulation von *MYC* durch FUSE, FUBP1 und FIR (modifiziert nach Hsiao *et al.*, 2010).

*MYC*-Promotors auf dem nicht-codierenden Strang befindet (Avigan *et al.*, 1990). Die einzelsträngige FUSE-Sequenz wird *in vitro* durch das KH3- und KH4-Motiv von FUBP1 erkannt (Braddock *et al.*, 2002b). Vermutlich wird die doppelsträngige DNA im Bereich um die FUSE-Sequenz durch die Helikase-Aktivität von FUBP1 entwunden (Vindigni *et al.*, 2001). Die Bindung durch FUBP1 an die FUSE-Sequenz ist zwar notwendig für die *MYC*-Expression, allerdings nicht ausreichend. Durch FUBP1 werden weitere *cis*-regulatorische Elemente und benötigte Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Dies wird über die Formierung einer DNA-Schleife erreicht. FUBP1 bindet so z.B. gleichzeitig die FUSE-Sequenz und einen am Transkriptionsstart lokalisierten Komplex, welcher den basalen Transkriptionsfaktor GTFIIH und die RNA Polymerase II enthält. Sowohl FUBP1 als auch GTFIIH interagieren mit einem weiteren Protein, dem *FBP interacting repressor* (FIR), welches basale Transkription zulässt, jedoch aktivierte Transkription inhibiert (Liu *et al.*, 2000). Die Rekrutierung von FIR an den *MYC*-Promotor führt zur Inhibierung der GTFIIH-Aktivität und legt die Transkription von *MYC* still (siehe Abbildung 2.12; Liu *et al.*, 2006).

### 2.3.6 Das FUBP1-Zielgen *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

Das Gen *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*, oft auch *c-MYC* benannt) wurde erstmals in Zusammenhang mit chromosomalen Translokationen in Patienten mit Burkitt-Lymphom entdeckt (Taub *et al.*, 1982). Es ist auf Chromosom 8 lokalisiert und umfasst drei Exons, von denen nur Exon 2 und 3 codierend sind (Dalla-Favera *et al.*, 1982; Neel *et al.*, 1982). *MYC* besitzt neben der bHLH-Struktur noch eine Leucin-Zipper Domäne (ZIP). Zusammen mit dem bHLHZIP-Protein MAX bindet es an E-Box-Motive (Blackwood *et al.*, 1991; Sommer *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde die Bindung von *MYC* auch an DNA ohne E-Box-Motiv gezeigt, so dass hier Protein-Protein-Interaktionen, ähnlich wie bei TAL1, der DNA-Bindung zugrunde liegen könnten (Margolin *et al.*, 2009; Zeller *et al.*, 2006).

*MYC* ist ein multifunktionaler Regulator, der an Zellproliferation, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. Aufgrund der Verschiedenheit seiner Funktionen ist die Einordnung in ein einfaches Modell nicht möglich (Chung *et al.*, 2005). Insgesamt sind ca. 15 % aller zellulären Gene Zielgene von *MYC*, weshalb *MYC* auch als „Globaler Amplifikator“ betrachtet wird (Dang *et al.*, 2006; Ott, 2014). Obwohl *MYC* im Allgemeinen mit einer Aktivierung der Genexpression assoziiert ist, weisen nicht transformierten Zellen eine negative Autoregulation von *MYC* auf, welche in Tumorzellen inaktiviert ist (Grignani *et al.*, 1990; Lombardi *et al.*, 1990; Penn *et al.*, 1990).

Im hämatopoetischen Kontext sorgt *MYC* in HSCs für das Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung (Delgado *et al.*, 2010). Obwohl *MYC* generell mit Zellproliferation und Inhibition der Differenzierung assoziiert ist, ist die *MYC*-Aktivität für die Expansion und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen notwendig. In LT-HSCs ist die *MYC*-Expression zunächst niedrig und nimmt dann mit zunehmender Differenzierung kontinuierlich bis zur Phase der Erythroblastenbildung zu. Wird *MYC* im Knochenmark überexprimiert, geht dies mit einer Freisetzung von LT-HSCs aus deren Nische und ihrer Differenzierung zu ST-HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen einher (Anantharaman *et al.*, 2011; Frojmark *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2009). Durch *MYC* wird die vorzeitige Reifung dieser Zellen verhindert (Acosta *et al.*, 2008). Eine Deregulierung von *MYC* ist in vielen hämatopoetischen Tumoren, Lymphomen und Leukämien zu finden, u.a. eine Überexpression in T-ALL (Bonnet *et al.*, 2011; Palomero *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2006). *c-myc*<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben an Tag 10.5 der Embryogenese (E10.5). Diese Letalität wird auch mit Defekten in der Vaskularisierung und der primitiven Erythropoese in Zusammenhang gebracht. Die Autoren vermuten, dass *MYC* in der Hämatopoese als Masterregulator von angiogenen Faktoren fungiert (Baudino *et al.*, 2002).

## 2.4 Zielsetzung

Die Homöostase wird durch transkriptionelle Regulation erreicht. Sowohl TAL1 als auch FUBP1 sind wichtige transkriptionelle Regulatoren. Während zahlreiche Forschungsarbeiten belegen, dass TAL1 essentiell für die Induktion der Hämatopoese und die erythroide Differenzierung ist, wurde die Rolle von FUBP1 in der Hämatopoese bisher nur im Kontext von HSCs wissenschaftlich untersucht (Rabenhorst *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016). Auf Basis von mRNA-Profilen wurde für FUBP1 jedoch eine Rolle in der Erythropoese mit einem hohen hierarchischen Rang unter den hämatopoetischen Masterregulatoren vorhergesagt (Novershtern *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2016). Der direkte Nachweis dafür wurde bislang noch nicht erbracht. Da der Promotor von *FUBP1* mögliche TAL1-Bindestellen aufweist, könnte eine potentielle Aktivität von FUBP1 während der erythroiden Differenzierung durch TAL1 reguliert werden. Die Aktivierung von *MYC* durch FUBP1 könnte ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von FUBP1 an der Erythropoese sein, da *MYC* eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und speziell in der erythroiden Differenzierung besetzt (Anantharaman *et al.*, 2011). Allerdings weist auch der Promotor von *MYC* potentielle TAL1-Bindestellen auf, sodass auch eine direkte Regulierung von *MYC* durch TAL1 möglich ist

In dieser Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Ist *FUBP1* ein neues direktes Zielgen von TAL1?
- Ist FUBP1 an der hämatopoetischen Differenzierung beteiligt?
- Wie wird *MYC* in der erythroiden Differenzierung reguliert?

Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sollte die Bindung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promoter festgestellt und kartiert werden. Die Regulation von *FUBP1* durch TAL1 sollte mit Luciferase-Reporterassays und der Analyse der *FUBP1*-Expression nach TAL1-Überexpression bzw. *knock down* nachgewiesen werden.

Zur Aufklärung der Rolle von FUBP1 in der hämatopoetischen Entwicklung war die Differenzierung von primären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) geplant. In diesem Kontext sollte durch den *knock down* von FUBP1 dessen Anteil am Differenzierungspotential der Primärzellen durch die Analyse der Kolonienformation in Methylzellulose, sowie der Expression von Differenzierungsmarkern bestimmt werden.

ChIP-Experimente und Luciferase-Reporterassays hatten das Ziel, die Regulierung von *MYC* durch TAL1 aufzuklären. Zusätzlich sollte die *MYC*-Expression nach TAL1-Überexpression und *knock down* analysiert werden. Außerdem dienten Expressionsanalysen nach Zellzyklussynchronisation und ChIP-Experimente in differenzierten HSPCs zur Aufklärung des möglichen Mechanismus der gemeinsamen *MYC*-Regulation durch FUBP1 und TAL1.

Da TAL1, FUBP1 sowie MYC mit Leukämie- bzw. Tumorerkrankungen und schlechten Therapieprognosen assoziiert sind, kann die Aufklärung des regulatorischen Netzwerks dazu beitragen Therapien zu verbessern. Dies könnte beispielsweise der Einsatz eines FUBP1-Inhibitors in einer mit TAL1 assoziierten akuten lymphatischen T-Zellleukämie (T-ALL) sein. Weiterhin könnte man FUBP1 auf seine Eignung als Biomarker in T-ALL testen und möglicherweise eine Korrelation mit einem besonders schlechten Krankheitsverlauf herstellen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Regulation von *FUBP1* durch *TAL1*

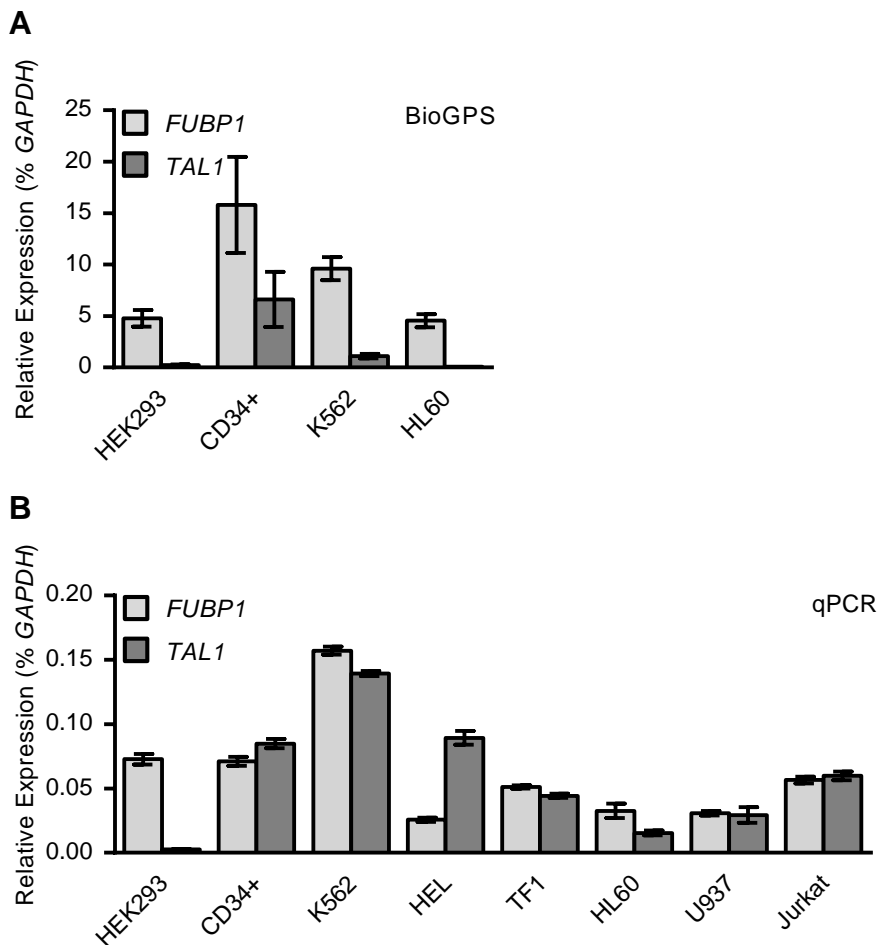
Kürzlich wurde gezeigt, dass das *far upstream element binding protein1* (*FUBP1*) wichtig für den Erhalt von hämatopoetischen Stammzellen ist (Rabenhorst *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016). In einem quantitativen Massenspektrometrie-Experiment wurde *FUBP1* als ein neuer Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* (*TAL1*) identifiziert (Dr. Stephan Kolodziej, Dr. Jörn Lausen, unveröffentlicht). Außerdem wurde eine Ko-Expression von *FUBP1* und *TAL1* in megakaryozytären / erythroiden Progenitorzellen (MEPs) nachgewiesen (Marek Kijonka, Prof. Dr. Martin Zörnig, unveröffentlicht). Das *TAL1*-Heterodimer bindet an das E-Box-Motiv CANNTG (Massari *et al.*, 2000), das zweimal in der Promotorregion von *FUBP1* vorhanden ist. Aufgrund dieser Hinweise wurde untersucht, ob die Expression von *FUBP1* durch *TAL1* reguliert wird und möglicherweise mit der Erythropoese assoziiert ist.

#### 3.1.1 *FUBP1* und *TAL1* werden in verschiedenen Zelllinien und hämatopoetischen Progenitorzellen ko-exprimiert

Da eine Ko-Expression auf eine mögliche funktionelle Beziehung zweier Gene bzw. ihrer Produkte hinweisen kann, wurden die Expressionsdaten der Datenbank BioGPS.org für *FUBP1* und *TAL1* in den humanen Zelllinien HEK293, K562 und HL60 sowie in den CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs, engl. *hematopoietic stem and progenitor cells*) analysiert (Wu *et al.*, 2016). Die Expression wurde zur besseren Vergleichbarkeit in dieser Arbeit auf das Referenzgen *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) normalisiert, dessen Daten ebenfalls von BioGPS.org stammen. *FUBP1* wird in allen analysierten Zellen exprimiert, wobei die Expression in CD34<sup>+</sup>- und K562-Zellen am höchsten ist. In CD34<sup>+</sup>-Zellen ist auch die stärkste *TAL1*-Expression vorhanden, während sie in den Zelllinien im Vergleich dazu nur sehr gering ist (siehe Abbildung 3.1A).

Um die Daten von BioGPS zu prüfen und noch zusätzliche hämatopoetische Zelllinien zu analysieren wurde die Expression der mRNA von *FUBP1* und *TAL1* in HEK293-, K562-, HEL-, TF1-, HL60-, U937- und Jurkat- sowie in CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels reverser Transkription (RT) und quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) gemessen und ebenfalls auf *GAPDH* normalisiert. Auch hier wurde die mRNA von *FUBP1* in allen Zellen detektiert. *TAL1* wird nicht in HEK293-Zellen renalen Ursprungs exprimiert, jedoch in allen hämatopoetischen Zellen (siehe Abbildung 3.1B). Die höchste *TAL1*-Expression fand sich in den K562- und HEL-Zellen, die beide der erythroiden Entwicklungslinie zugeordnet werden, sowie den HSPCs. In Jurkat-Zellen wird *TAL1* ebenfalls stark exprimiert. Die Ko-

Expression beider Gene auf dem höchsten Niveau wurde in den K562-Zellen detektiert; darauf folgten die HSPCs und die Jurkat-Zellen. Da die stärkste Ko-Expression in den K562-Zellen erythroiden Ursprungs und in HSPCs gemessen wurde, sollten CD34<sup>+</sup>-Zellen in die erythroide Richtung differenziert werden um hier die Ko-Expression von *FUBP1* und *TAL1* zu untersuchen.



**Abbildung 3.1: Expression von FUBP1 und TAL1 in verschiedenen Zelllinien und hämatopoetischen Vorläuferzellen.** (A) Die in der Datenbank BioGPS.org hinterlegten Werte für die Genexpression von *FUBP1* und *TAL1* in HEK293-, CD34<sup>+</sup>-, K562- und HL60-Zellen wurden jeweils auf die Expression des Referenzgens *GAPDH* bezogen. *FUBP1* wurde in allen analysierten Zellen exprimiert, wobei in den hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen zusätzlich die höchste Expression von *TAL1* vorlag. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen den von BioGPS.org verwendeten Datensätzen an (Wu *et al.*, 2016). (B) Außerdem wurde eine Genexpressionsanalyse mittels RT und qPCR mit der mRNA aus HEK293-, CD34<sup>+</sup>-, K562-, HEL-, TF1-, HL60-, U937- und Jurkat-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Werte der unterschiedlichen Zellen jeweils auf die Expression des Referenzgens *GAPDH* bezogen. In CD34<sup>+</sup>-, K562- und in Jurkat-Zellen wurde *FUBP1* bei einer gleichzeitig hoher *TAL1*-Expression am stärksten exprimiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Replikaten an.

### 3.1.2 *FUBP1* und *TAL1* werden in erythroid differenzierten Zellen exprimiert

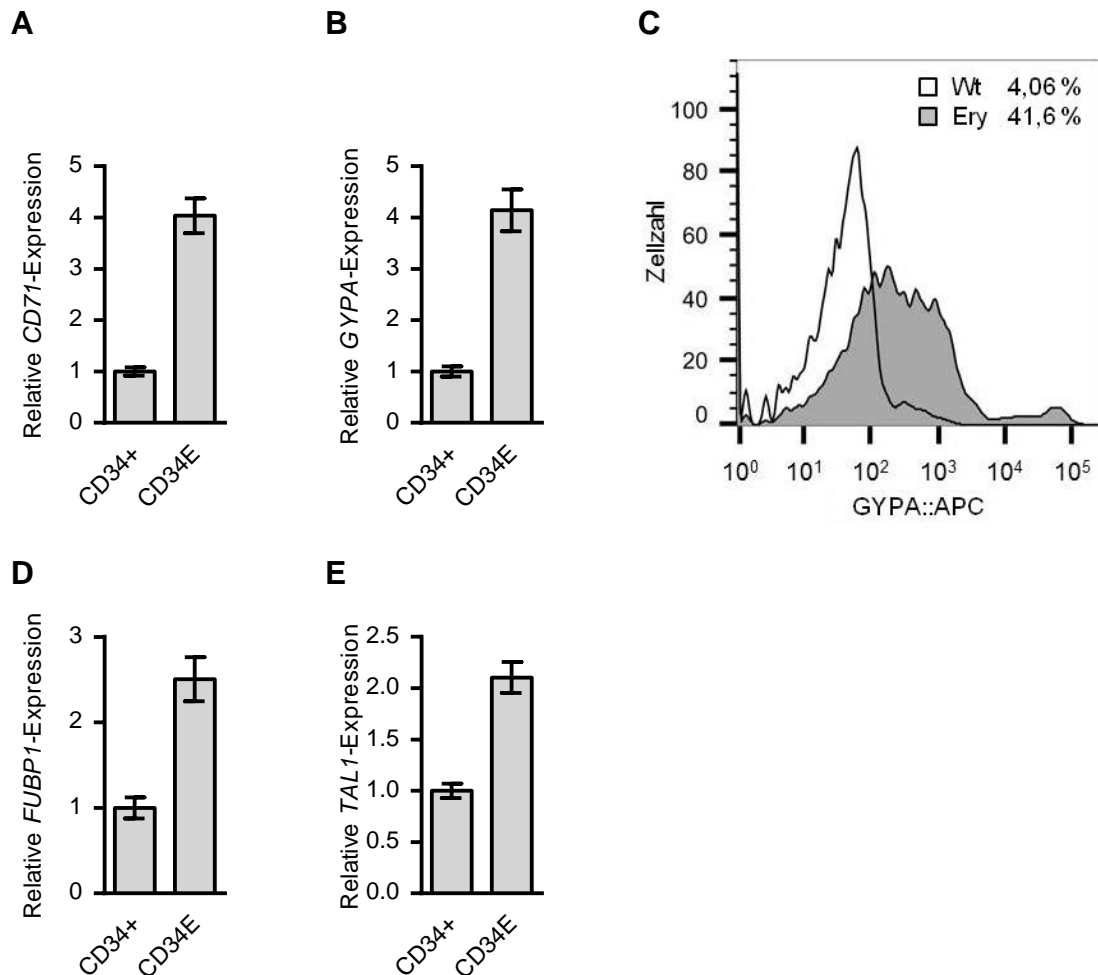
Nach ersten Hinweisen einer Ko-Expression von *FUBP1* und *TAL1* in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie sowie in hämatopoetischen Vorläuferzellen, wurden humane CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Erythropoetin (EPO) in die erythroide Richtung differenziert. Auch hier sollte die Expression von *FUBP1* und *TAL1* gemessen werden, um eine mögliche Ko-Expression und somit einen Zusammenhang der Expression der beiden Gene während der Erythropoese zu zeigen. Die Differenzierung der Vorläuferzellen mit Thrombopoetin (TPO) in Richtung Megakaryozyten sollte Aufschluss über die Expression von *FUBP1* in der megakaryozytären Linie geben, was ein Indiz für eine potentielle Rolle von *FUBP1* in MEPs und nicht nur in der erythroiden Entwicklungslinie wäre. Aus dem Blut von mit *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) behandelten Stammzellspendern wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen isoliert und vier Tage expandiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn Tage in Gegenwart von EPO bzw. TPO differenziert. Der Differenzierungsstatus wurde durch die Analyse der Expression von Differenzierungsmarkern mittels Durchflusszytometrie und qPCR überprüft und anschließend durch die qPCR-Analyse der RNA aus den differenzierten Zellen die Expression von *FUBP1* und *TAL1* ermittelt.

Im Vergleich mit unbehandelten CD34<sup>+</sup>-Zellen war die mRNA-Expression der erythroiden Marker *CD71* (siehe Abbildung 3.2A) und *Glycophorin A* (*GYPA*, Synonym für *CD235a*; siehe Abbildung 3.1B) in den mit EPO behandelten Zellen um das 4-fache erhöht. Diese Zellen exprimierten auch zehnmal häufiger CD235a an der Zelloberfläche (siehe Abbildung 3.2C). Die mit EPO behandelten Zellen zeigten eine starke Zunahme der Expression erythroider Marker, besonders von *GYPA* an der Zelloberfläche und wiesen außerdem eine deutliche, durch Hämoglobin verursachte, Rotfärbung auf. Somit liegt eine erfolgreiche erythroide Differenzierung der HSPCs vor. *FUBP1* (siehe Abbildung 3.2D) wurde, ebenso wie *TAL1* (siehe Abbildung 3.2E), in den erythroiden Zellen etwa um das doppelte hochreguliert, was ein weiterer Hinweis auf eine zusammenhängende Genexpression sein könnte.

In den mit TPO behandelten Zellen nahm die Expression der mRNA von *CD41* (siehe Abbildung 3.3A) und *CD42b* (siehe Abbildung 3.3B) jeweils etwa um das 10-fache zu. Die Überprüfung mittels Durchflusszytometrie ergab, dass die Zellen durch die TPO-Behandlung dreimal häufiger CD41 an der Zelloberfläche exprimierten (siehe Abbildung 3.3C). Die Behandlung mit TPO führte also zu einer megakaryozytären Differenzierung. Während *FUBP1* in den megakaryozytär differenzierten Zellen unverändert vorlag (siehe Abbildung 3.3D), erhöhte sich die *TAL1*-Expression um das 7-fache (siehe Abbildung 3.3E).

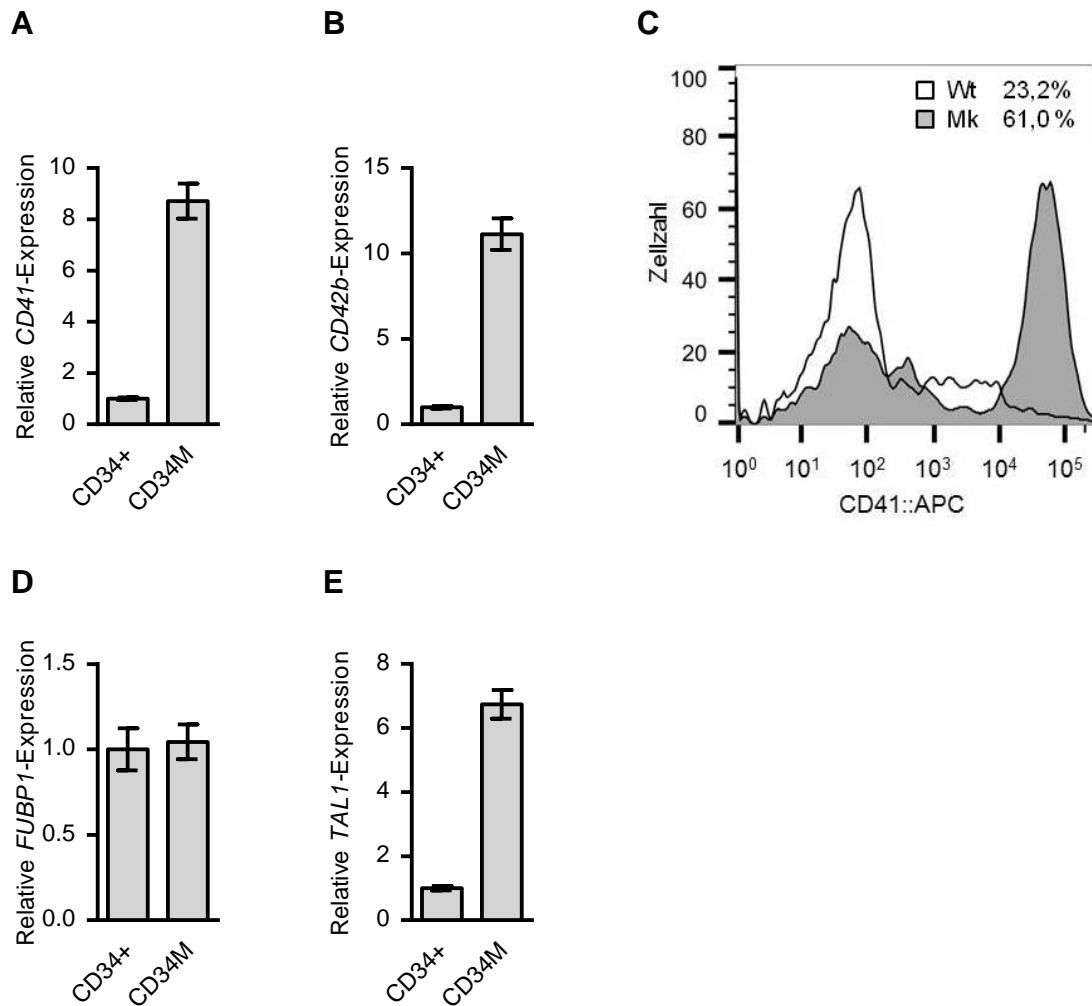
*FUBP1* wurde vermehrt in den erythroid differenzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Dies deutet auf eine Rolle von *FUBP1* während der Erythropoese hin. Dagegen war keine

Veränderung in der Expression von *FUBP1* in den megakaryozytär differenzierten Zellen zu detektieren. Dies lässt zunächst keine Schlüsse auf eine Beteiligung von *FUBP1* an der Megakaryopoese zu.



**Abbildung 3.2: Expression von Differenzierungsmarkern sowie *FUBP1* und *TAL1* in erythroid differenzierten  $CD34^+$ -Zellen.**  $CD34^+$  Stamm- und Vorläuferzellen wurden zur Differenzierung mit Erythropoetin (EPO) behandelt ( $CD34E$ ; Ery). Die Differenzierungsmarker wurden auf mRNA-Ebene durch RT und qPCR sowie deren Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die mRNA-Expression der erythroiden Marker **(A)** *CD71* und **(B)** *GYPA* war deutlich erhöht. **(C)** Die mit EPO behandelten Zellen exprimierten zehnmal häufiger *GYPA* an der Zelloberfläche, verglichen mit unbehandelten Zellen (Wt). Als Fluorophor zur Detektion mittels Durchflusszytometrie wurde APC verwendet. Angegeben ist der prozentuale Anteil der *GYPA*-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die erythroid differenzierten Zellen wiesen außerdem eine Verdoppelung der mRNA von **(D)** *FUBP1* und **(E)** *TAL1* auf. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Replikaten an.



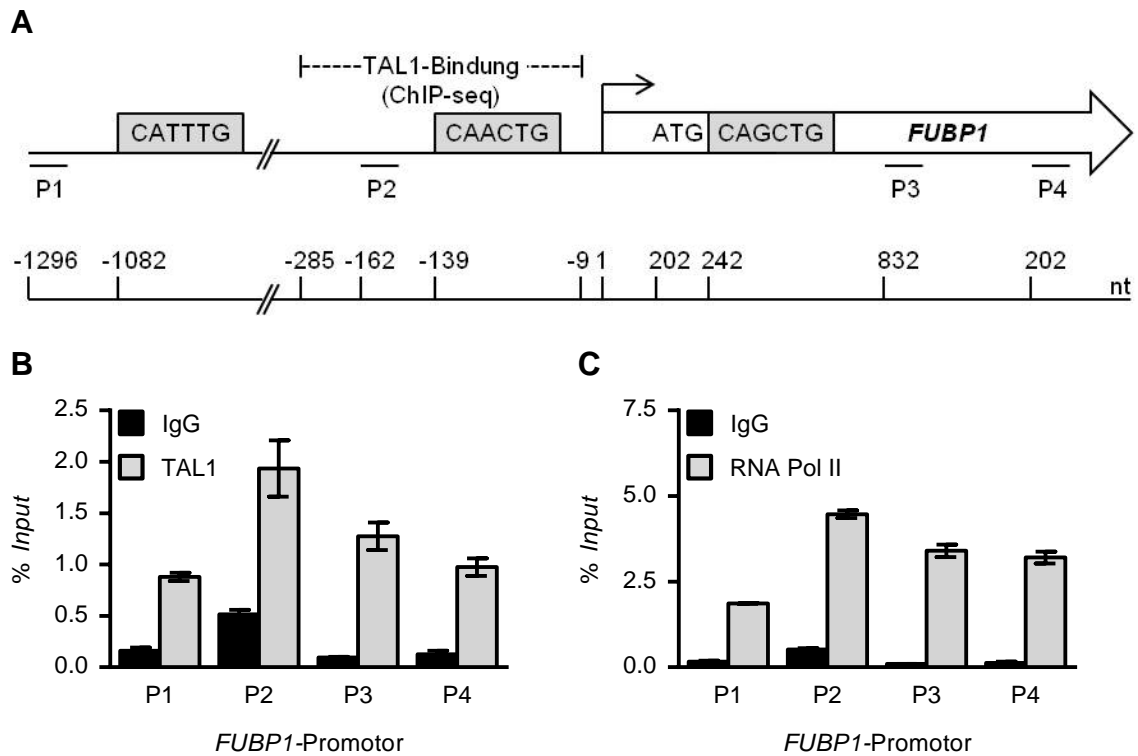


**Abbildung 3.3: Expression von Differenzierungsmarkern sowie *FUBP1* und *TAL1* in megakaryozytär differenzierten  $CD34^+$ -Zellen.**  $CD34^+$  Stamm- und Vorläuferzellen wurden zur Differenzierung mit Thrombopoetin (TPO) behandelt (CD34M; Mk). Die Differenzierungsmarker wurden auf mRNA-Ebene durch RT und qPCR sowie deren Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die Expression der megakaryozytären Marker **(A)** *CD41* sowie **(B)** *CD42b* auf mRNA-Ebene war stark erhöht. **(C)** Die TPO-Behandlung führte auch siebenmal häufiger als in unbehandelten Zellen (Wt) dazu, dass *CD41* an der Zelloberfläche exprimiert wird. Als Fluorophor zur Detektion mittels Durchflusszytometrie wurde APC verwendet. Angegeben ist der prozentuale Anteil der *CD41*-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die megakaryozytär differenzierten Zellen wiesen keine Veränderung der mRNA-Expression von **(D)** *FUBP1* auf, während **(E)** *TAL1* stärker exprimiert wurde. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Replikaten an.

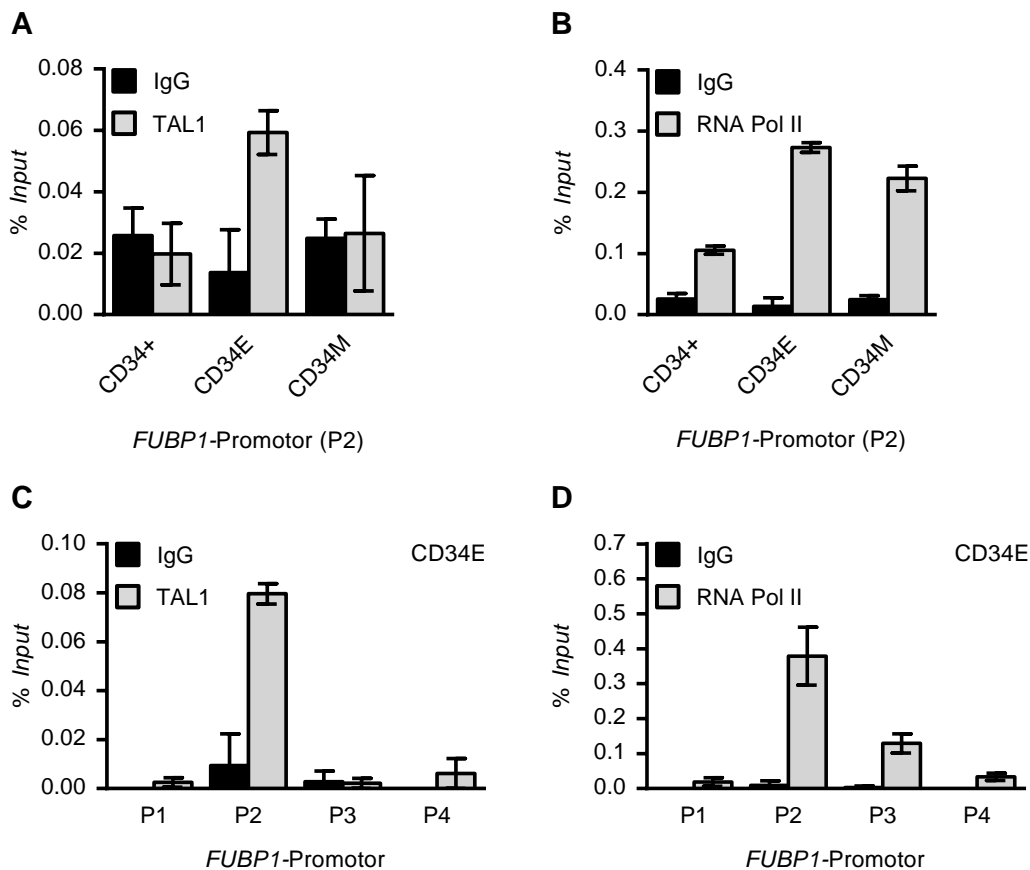
### 3.1.3 TAL1 besetzt den *FUBP1*-Promotor in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie

In Zellen der erythroiden Entwicklungslinie wurde eine gleichzeitige Expression von *FUBP1* und *TAL1* gemessen. Außerdem enthält der Promotorbereich von *FUBP1* zwei E-Boxen als Bindemotive für *TAL1*. Die nahe am Translationsstart lokalisierte E-Box liegt in einem Bereich, für den in einer Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) in K562-Zellen bereits eine *TAL1*-Bindung gemessen wurde (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Daher sollte nun überprüft werden, ob tatsächlich eine Bindung von *TAL1* auf dem *FUBP1*-Promotor gezeigt werden kann und ob dies differenzierungsabhängig ist. Zunächst wurde in unbehandelten K562-Zellen ein ChIP-Experiment durchgeführt um die Bindung von *TAL1* auf dem *FUBP1*-Promotor zu überprüfen. Die potentielle Bindestelle sollte außerdem näher kartiert werden. Anschließend sollten Lysate der in Richtung Erythrozyten bzw. Megakaryozyten differenzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen (siehe 3.1.2) in ein ChIP-Experiment eingesetzt werden um mögliche Änderungen der Bindung von *TAL1* auf dem *FUBP1*-Promotor während der Differenzierung zu analysieren. Die Präzipitation erfolgte mit Antikörpern gegen *TAL1* und die RNA-Polymerase II, welche die Transkription von Genen katalysiert und somit mit einem aktiven Genstatus assoziiert ist (Kershner *et al.*, 1998). Zur Analyse der Bindung auf dem Promotor wurden in einer qPCR Primerpaare verwendet, welche die Sequenzbereiche in der Nähe und in zunehmendem Abstand von den möglichen *TAL1*-Bindestellen amplifizieren und somit eine Kartierung ermöglichen sollten (siehe Abbildung 3.4A).

In der Region um die nahe am Transkriptionsstart lokalisierte E-Box (P2; -162 nt) war die relative Anreicherung von *TAL1* auf dem *FUBP1*-Promotor mit 2 % des *Inputs* am höchsten. In den dazu weiter entfernten Bereichen sank die Anreicherung bis auf die Hälfte ab (siehe Abbildung 3.4B). Die RNA-Polymerase II wurde mit beinahe 5 % ebenfalls am stärksten im Bereich um den Transkriptionsstart detektiert. 1,3 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts (P1) betrug die Anreicherung nur noch etwa 2 % (siehe Abbildung 3.4C). Für das nachfolgende ChIP-Experiment in den differenzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde das Primerpaar P2 eingesetzt, da in dieser Region die höchste Anreicherung gemessen wurde.



**Abbildung 3.4: Schematische Übersicht des *FUBP1*-Promotors und dessen Besetzung mit TAL1 und der RNA-Polymerase II in K562-Zellen. (A)** Im Promotorbereich von *FUBP1* sind zwei Bindemotive (E-Boxen in Grau; CANN TG) für TAL1 vorhanden. Zusätzlich befindet sich eine E-Box nahe dem Translationsstart (ATG; nt 202). In K562-Zellen wurde durch eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) eine Sequenz im Promotorbereich identifiziert, in deren Bereich TAL1 bindet (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Dieser Bereich umfasst die nahe am Transkriptionsstart (Pfeil) lokalisierte E-Box. Vier verschiedene Primerpaare (P1-P4) dienten der Kartierung der TAL1-Bindung in einem ChIP-Experiment. **(B)** In unbehandelten K562-Zellen wurde in einem ChIP-Experiment mit einem gegen TAL1 gerichteten Antikörper eine Anreicherung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor gemessen. Die Anreicherung war am höchsten im Bereich der nahe zum Transkriptionsstart stromaufwärts gelegenen E-Box. Mit zunehmender Entfernung zu dieser E-Box nahm die Anreicherung ab. **(C)** Mit einem Antikörper gegen die RNA-Polymerase II wurde in einem ChIP-Experiment in unbehandelten K562-Zellen die höchste Anreicherung der RNA-Polymerase II auf dem *FUBP1*-Promotor im Bereich um den Transkriptionsstart detektiert. Dargestellt ist die prozentuale Anreicherung im Vergleich mit dem *Input*. Gezeigt wird einer von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei Replikaten an. nt - Nukleotide.



**Abbildung 3.5: Bindung von TAL1 und der RNA-Polymerase II auf dem *FUBP1*-Promotor in erythroid und megakaryozytär differenzierten  $CD34^+$ -Zellen.**  $CD34^+$  Stamm- und Vorläuferzellen wurden zur erythroiden Differenzierung mit Erythropoetin (EPO) und zur megakaryozytären Differenzierung mit Thrombopoetin (TPO) behandelt (CD34E, CD34M). Lysate dieser Zellen wurden in eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen TAL1 und die RNA-Polymerase II eingesetzt. Vier verschiedene Primerpaare (P1-P4), die Sequenzbereiche in unterschiedlicher Entfernung zu TAL1-Bindemotiven amplifizierten, wurden zur Kartierung des *FUBP1*-Promotors in den erythroid differenzierten Zellen eingesetzt. **(A)** Eine Anreicherung für TAL1 wurde nur in den erythroid differenzierten Zellen gemessen, **(B)** während die RNA-Polymerase II immer auf dem *FUBP1*-Promotor zu finden war, mit der größten Anreicherung in erythroid differenzierten Zellen. **(C)** TAL1 besetzte den Promotor der erythroid differenzierten Zellen ausschließlich im Bereich der näher zum Transkriptionsstart stromaufwärts lokalisierten E-Box (P2). **(D)** Hier war auch die Bindung der RNA-Polymerase II am höchsten. Dargestellt ist die prozentuale Anreicherung im Vergleich mit dem *Input*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Replikaten an.

Nachdem die Bindung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor gezeigt werden konnte, wurden in einem weiteren ChIP-Experiment die Lysate erythroid und megakaryozytär differenzierter HSPCs eingesetzt. Die qPCR-Analyse erfolgte mit dem Primerpaar P2. Nur in den erythroid differenzierten Zellen ließ sich eine Anreicherung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor mit 0,06 % des *Inputs* messen (siehe Abbildung 3.5A). In diesen Zellen

war mit 0,3 % des *Inputs* auch am meisten RNA-Polymerase II im Promotorbereich vorhanden. In den megakaryozytär differenzierten Zellen wurde beinahe ein ebenso hoher Wert für die RNA-Polymerase II gemessen, während in den unbehandelten Zellen die RNA-Polymerase II-Anreicherung nur etwa ein Drittel davon betrug (siehe Abbildung 3.5B). Da nur in den in Richtung Erythrozyten differenzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen eine Anreicherung von TAL1 vorhanden war, wurde die Kartierung des Promotorbereiches auch nur in diesen Zellen durchgeführt.

Die Kartierung in den erythroiden Zellen ergab eine deutliche Anreicherung im Bereich um die näher am Transkriptionsstart von *FUBP1* gelegene E-Box mit 0,08 % des *Inputs* (P2), während in den anderen Bereichen keine Anreicherung von TAL1 messbar war (siehe Abbildung 3.5C). Auch die Konzentration der RNA-Polymerase II war um den Transkriptionsstart herum am stärksten mit 0,4 % des *Inputs* und nahm mit zunehmender Entfernung ab (siehe Abbildung 3.5D).

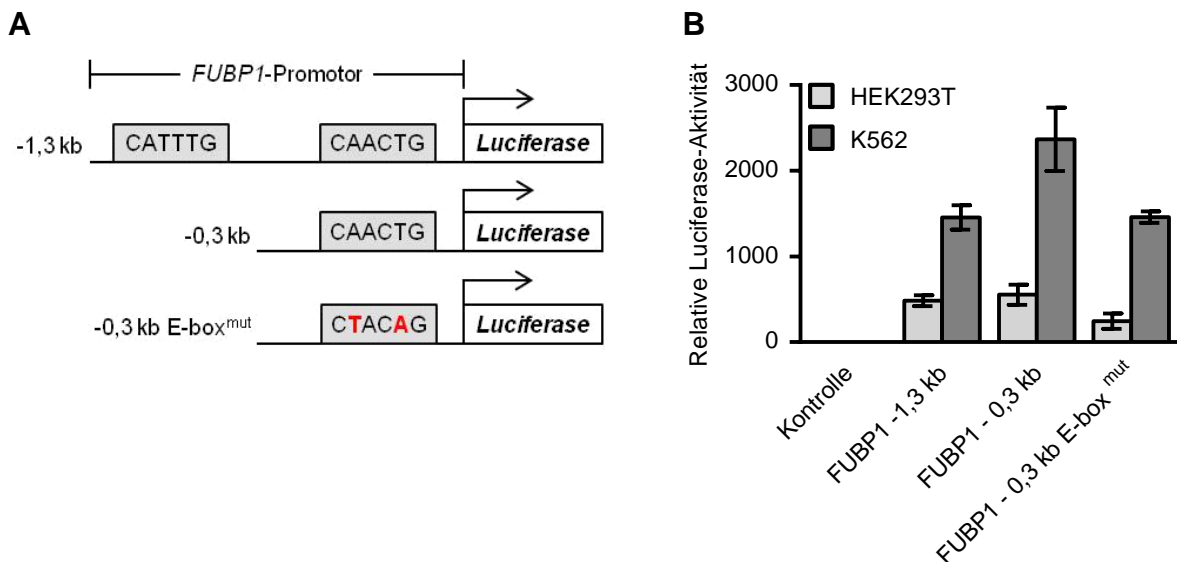
TAL1 wurde am stärksten auf dem Promotor von *FUBP1* in einem Bereich um ein vorher *in silico* identifiziertes TAL1-Bindemotiv nahe zum Transkriptionsstart detektiert. Dies bestätigt außerdem die in einem ChIP-seq-Experiment ermittelte TAL1-Bindung auf dem *FUBP1*-Promotor und grenzt den Bereich der Bindung weiter ein. Ein weiteres potentiell TAL1-Bindemotiv, welches 1,8 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt lokalisiert ist, wies weniger (K562-Zellen) bzw. keine (CD34<sup>+</sup>-Zellen) Bindung durch TAL1 auf. Am Transkriptionsstart war auch eine starke Anreicherung der RNA-Polymerase II zu finden, was auf eine mögliche Expression von *FUBP1* unter der Beteiligung von TAL1 hindeutet. Die Bindung von TAL1 wurde nur in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie beobachtet.

#### **3.1.4 Der *FUBP1*-Promotor wird in Anwesenheit von TAL1 aktiviert**

Die Bindung von TAL1 auf dem Promotor von *FUBP1* wurde in zwei unterschiedlichen erythroiden Zellsystemen gezeigt. Außerdem wurde die Bindung auf die näher am Transkriptionsstart gelegene E-Box eingegrenzt. Um zu überprüfen, ob dieser Bereich tatsächlich relevant für die Aktivierung des *FUBP1*-Promotors ist, wurde eine Promotorstudie durchgeführt. Dabei wurden drei Konstrukte des *FUBP1*-Promotors vor ein Luciferase-Reporter gen kloniert und über die Luciferaseexpression die jeweilige Aktivität bestimmt (siehe Abbildung 3.6A). Das -1,3 kb-Konstrukt enthielt beide E-Boxen, das -0,3 kb-Konstrukt enthielt nur die näher am Transkriptionsstart gelegene E-Box. Dieses Konstrukt wurde zusätzlich mit zwei Punktmutationen in der E-Box eingesetzt, die eine TAL1-Bindung verhindern sollten. Die Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert, welche kein endogenes TAL1 exprimieren, und in K562-Zellen, die TAL1 überexprimieren, da dies Hinweise auf die Aktivität des *FUBP1*-Promotors in Gegenwart von TAL1 liefern könnte.

Die Aktivität aller drei Konstrukte war in den K562-Zellen mindestens 3-fach höher als in den HEK293T-Zellen. Das -0,3 kb-Konstrukt mit einer intakten E-Box zeigte in beiden Zelllinien die größte Aktivität, während die Mutation der E-Box eine Reduktion der Aktivität auf ca. 50 % in den HEK293T-Zellen und ca. 60 % in den K562-Zellen zur Folge hatte (siehe Abbildung 3.6B).

Die Sequenz nahe dem Transkriptionsstart von *FUBP1*, welche nur eine E-Box enthält, scheint für die Aktivität des *FUBP1*-Promotors wichtiger zu sein, als die weiter entfernten Sequenzbereiche mit einer zusätzlichen E-Box, da die höhere Aktivität mit dem kürzeren Konstrukt auftrat. Dass die Aktivität in Anwesenheit von TAL1 stark erhöht war und durch eine Mutation in dessen Bindemotiv wieder reduziert wurde, sind Hinweise auf eine Rolle von TAL1 in der Aktivierung von *FUBP1*.

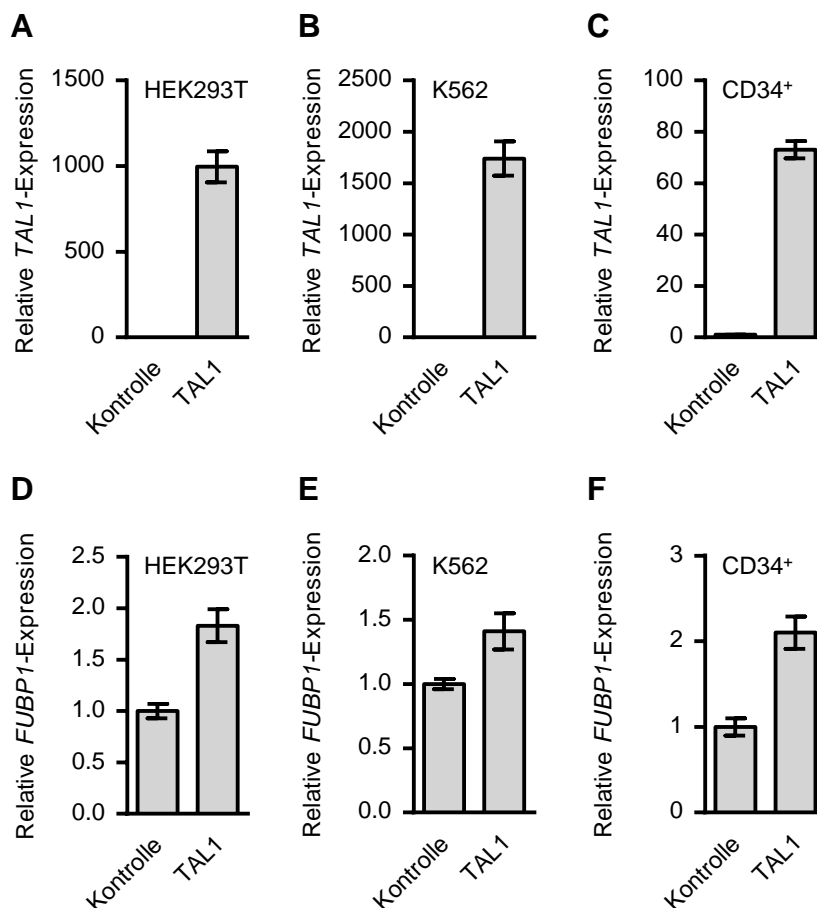


**Abbildung 3.6: Aktivität des *FUBP1*-Promotors in HEK293T- und K562-Zellen. (A)** In eine Promotoranalyse mittels eines Luciferase-Reportergens wurden drei Konstrukte des *FUBP1*-Promotors eingesetzt. Auf dem längsten Konstrukt waren beide stromaufwärts gelegenen E-Boxen vorhanden (-1,3 kb). Eine trunkierte Form enthielt nur die näher zum Transkriptionsstart lokalisierte E-Box (-0,3 kb). Diese lag in einem dritten Konstrukt mit einer Mutation vor (-0,3 kb E-box<sup>mut</sup>). **(B)** Alle drei Konstrukte zeigten in K562-Zellen eine deutlich höhere Aktivität, als in HEK293T-Zellen. Außerdem wurde die höchste Aktivität für das trunkierte Konstrukt mit intakter E-Box gemessen, während die anderen beiden Konstrukte jeweils eine um etwa ein Drittel reduzierte Aktivität aufwiesen. Die Aktivität des Leervektors wurde als 1 festgelegt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von jeweils vier Replikaten an.

### 3.1.5 TAL1 aktiviert die *FUBP1*-Expression in verschiedenen Zellen

Da gezeigt wurde, dass TAL1 möglicherweise die Aktivierung des *FUBP1*-Promotors bewirkt, sollte nun weiter untersucht werden, wie sich TAL1 auf die Expression von *FUBP1* auswirkt. Dazu wurde *TAL1* in HEK293T-, K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen ektopisch exprimiert und die Expression von *FUBP1* mittels RT und qPCR gemessen.

In allen drei Zellsystemen wurde ein starker Anstieg der *TAL1*-Expression detektiert (siehe Abbildung 3.7A-C). Gleichzeitig wurde *FUBP1* vermehrt exprimiert. In HEK293T- (siehe Abbildung 3.7D) und CD34<sup>+</sup>-Zellen (siehe Abbildung 3.7F) verdoppelte sich die Menge etwa, während in K562-Zellen ein Anstieg auf die 1,5-fache Menge gemessen wurde (siehe Abbildung 3.7E). Die Überexpression von *TAL1* induziert also die Expression von *FUBP1*.

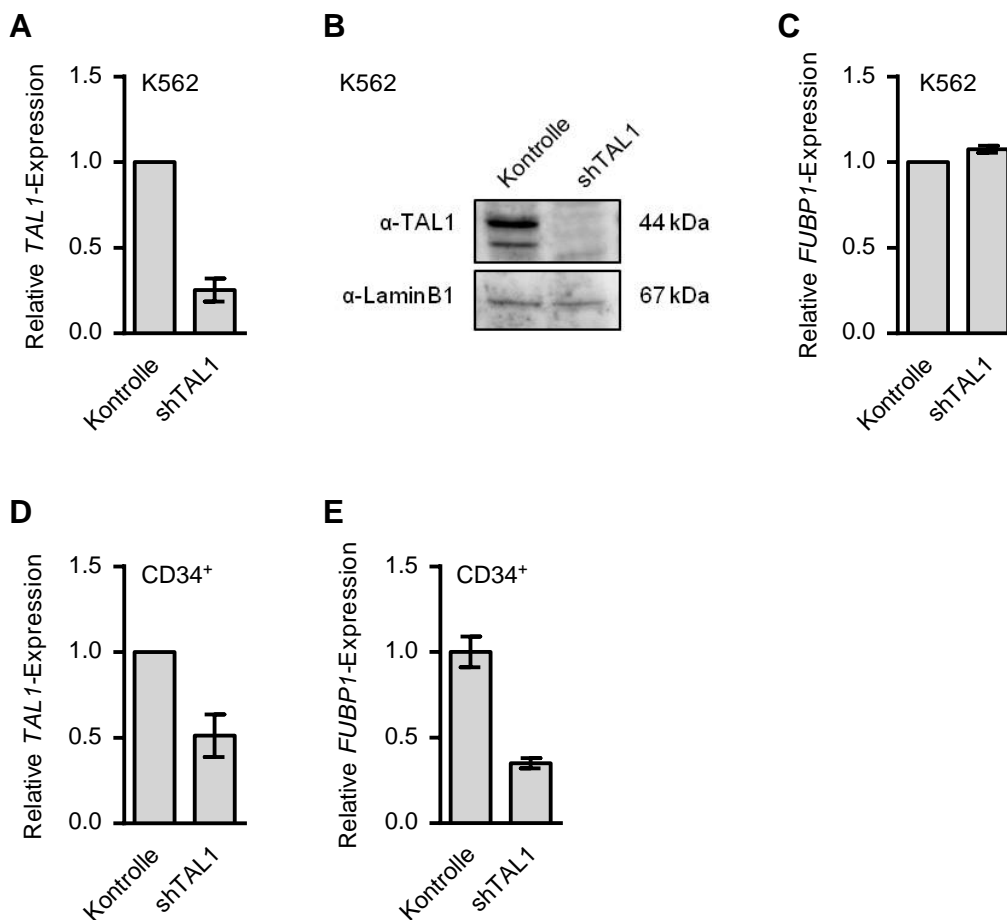


**Abbildung 3.7: Die Überexpression von *TAL1* in HEK293T-, K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen induziert die *FUBP1*-Expression.** In verschiedenen Zellsystemen wurde *TAL1* ektopisch exprimiert und dann mittels RT und qPCR die Expression von *FUBP1* bestimmt. **(A)** In HEK293T-, **(B)** K562- und **(C)** CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde nach der Überexpression von *TAL1* auch **(D-F)** *FUBP1* hochreguliert. Als Referenzgen wurde *TBP* in HEK293T-Zellen und *GAPDH* in K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von mindestens zwei Replikaten an.

### 3.1.6 Die *FUBP1*-Expression ist nach einem *knock down* von *TAL1* in hämatopoetischen Vorläuferzellen reduziert

Die Überexpression von *TAL1* in verschiedenen Zellsystemen hatte eine vermehrte *FUBP1*-Expression zur Folge. Da durch Überexpression mittels Expressionsvektoren auch unspezifische Effekte auftreten können, und um die Beteiligung von *TAL1* an der Regulation von *FUBP1* spezifischer nachzuweisen, sollte die *FUBP1*-Expression nach einem *knock down* von *TAL1* gemessen werden. Dazu wurden K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen mit einer gegen *TAL1* gerichteten *small hairpin* RNA (shRNA; shTAL1) transduziert und RT und qPCR zur Bestimmung der Effizienz des *TAL1*-*knock down* und der *FUBP1*-Expression verwendet.

In K562-Zellen war zwar nach dem *knock down* von *TAL1* auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 3.8A) und Protein-Ebene (siehe Abbildung 3.8B) eine klare Reduktion von *TAL1* zu sehen, jedoch blieb die Expression von *FUBP1* unverändert (siehe Abbildung 3.8C). In CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde *TAL1* nach der Transduktion von shTAL1 nur noch zu 51 % exprimiert (siehe Abbildung 3.8D), während die *FUBP1*-Expression sogar auf 35 % zurückging (siehe Abbildung 3.8E). Die Regulation von *FUBP1* unterscheidet sich also in K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen, wobei sie in den CD34<sup>+</sup>-Zellen von *TAL1* abhängig ist.





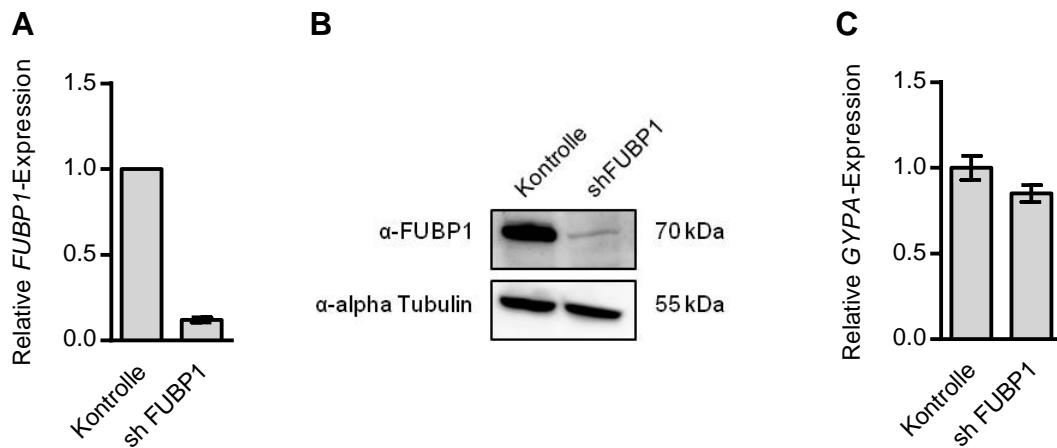
---

**Abbildung 3.8: Die Expression von *FUBP1* ist nach dem *knock down* von *TAL1* in hämatopoetischen Vorläuferzellen reprimiert.** (A) Nach einem *knock down* von *TAL1* in K562-Zellen mit einer gegen *TAL1* gerichteten shRNA (sh*TAL1*) war die Expression von *TAL1* auf mRNA- und (B) Protein-Ebene stark reduziert. Als Ladekontrolle für den Western Blot wurde ein Antikörper gegen LaminB1 verwendet. (C) Die Expression von *FUBP1* war dagegen unverändert. In CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde nach Herabregulation von (D) *TAL1* auch wesentlich weniger (E) *FUBP1* exprimiert. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus (A, C, D) mindestens zwei unabhängigen Versuchen bzw. (E) von drei Replikaten an. kDa – Kilodalton.

### 3.1.7 Nach dem *knock down* von *FUBP1* ist die *GYPA*-Expression in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie in ihrer Tendenz leicht vermindert

Da eine Aktivierung von *FUBP1* durch *TAL1* in HSPCs und in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie gezeigt wurde, sollte nun ermittelt werden, ob *FUBP1* einen Einfluss auf die Expression von erythroiden Differenzierungsmarkern hat. Dies könnte einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung von *FUBP1* während der erythroiden Differenzierung geben. Als einer der wichtigsten erythroiden Marker wurde *GYPA* (Andersson *et al.*, 1979; Furthmayr *et al.*, 1976) zur weiteren Analyse ausgewählt. Um dessen Expression zu ermitteln, wurden K562-Zellen mit einer gegen *FUBP1* gerichteten shRNA (sh*FUBP1*) transduziert und die *knock down*-Effizienz durch RT mit anschließender qPCR gemessen. Die Expression von *FUBP1* ging nach der Transduktion von sh*FUBP1* auf ca. 12 % zurück (siehe Abbildung 3.9A). Auch im Western Blot wurde kaum noch *FUBP1* detektiert (siehe Abbildung 3.9B). Die Expression von *GYPA* war mit 85 % nur leicht vermindert (siehe Abbildung 3.9C).

Die Effizienz des shRNA-Konstrukts gegen *FUBP1* wurde in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie gezeigt. Außerdem führte der *knock down* von *FUBP1* zu einer tendenziell leicht verminderten Expression des erythroiden Markers *GYPA*. Vor allem die Funktionalität des shRNA-Konstrukts ist ausschlaggebend für weitere Versuche. Da in den vorangegangenen Versuchen bereits Unterschiede in der transkriptionellen Regulation von K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen gezeigt wurden, sollte sh*FUBP1* nun in einem Differenzierungsversuch in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen eingesetzt werden.



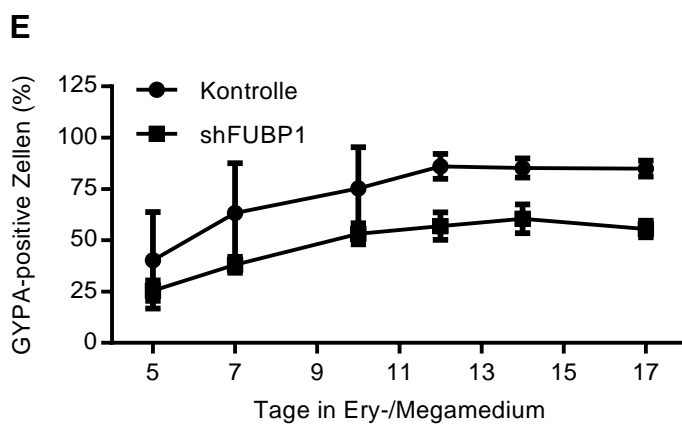
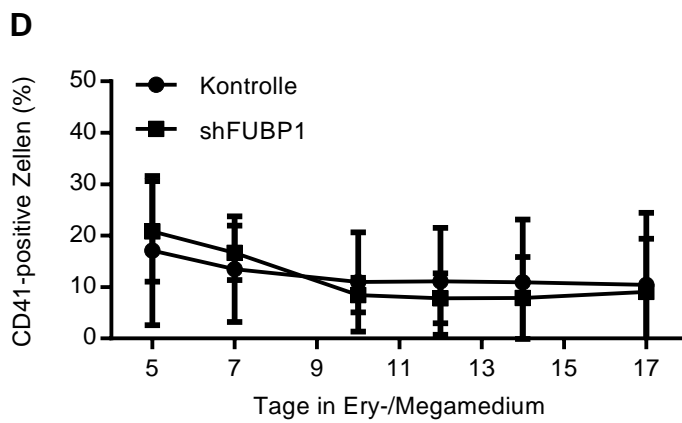
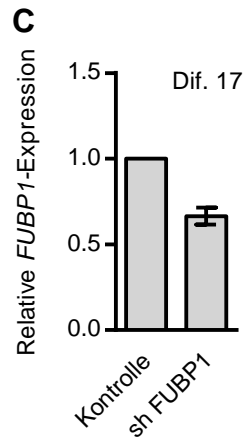
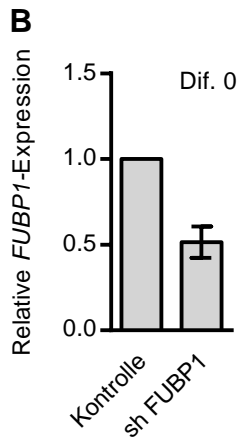
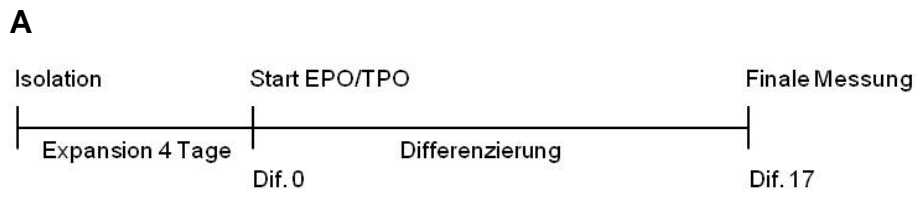
**Abbildung 3.9: Nach dem *knock down* von *FUBP1* ist die Expression von *GYPA* in K562-Zellen leicht vermindert.** K562-Zellen wurden mit einer gegen *FUBP1* gerichteten shRNA (shFUBP1) transduziert und die Genexpression mittels RT und qPCR gemessen. Die Proteinexpression wurde im Western Blot analysiert. Nach der Transduktion der shRNA ging die Expression von FUBP1 **(A)** auf mRNA- und **(B)** Proteinebene sehr stark zurück. Als Ladekontrolle für den Western Blot wurde ein Antikörper gegen alpha Tubulin verwendet. **(C)** Die Expression von *GYPA* war tendenziell ebenfalls leicht vermindert. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (A) aus drei unabhängigen Versuchen bzw. (C) von drei Replikaten an.

### 3.1.8 Bei verminderter Expression von *FUBP1* ist die *GYPA*-Expression während der erythroid-megakaryozytären Differenzierung reprimiert

Die Funktionalität der gegen *FUBP1* gerichteten shRNA wurde in K562-Zellen gezeigt. shFUBP1 sollte nun in HSPCs transduziert werden und die Expression der Differenzierungsmarker CD41 sowie *GYPA* (in Form von CD235a) an der Zelloberfläche während der Differenzierung gemessen werden. Dazu wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen mit shFUBP1 transduziert. Der *knock down* wurde durch eine RT mit anschließender qPCR überprüft. Nach 4 Tagen wurden die transduzierten GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert und für weitere 17 Tage in einem Flüssigmedium kultiviert, welches sowohl erythroide als auch megakaryozytäre Differenzierung zulässt. Die Expression von CD41 und *GYPA* wurde alle 2 bis 3 Tage mit einem spezifischen Antikörper mittels Durchflusszytometrie ermittelt (siehe Abbildung 3.10A). Der Versuch wurde dreimal mit Vorläuferzellen unterschiedlicher Stammzellspender durchgeführt.

*FUBP1* war 4 Tage nach der Transduktion der shRNA auf 55 % (siehe Abbildung 3.10B) herab reguliert und stieg nach 17 Tagen im Differenzierungsmedium auf 67 % an (siehe Abbildung 3.10C). In der Expression von CD41 konnte kein Unterschied zwischen Zellen mit verminderter *FUBP1*-Expression und Kontrollzellen festgestellt werden. Etwa 10 bis 20 % der Zellen exprimierten CD41 an der Oberfläche (siehe Abbildung 3.10D). Hierbei fielen allerdings die großen Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Spendern auf, was sich in der hohen Standardabweichung widerspiegelt. Die Menge an *GYPA* stieg in Kontrollzellen und in Zellen mit verminderter *FUBP1*-Expression zwischen Tag 5 und Tag 12 an. Ab Tag 12 der Differenzierung wurde deutlich weniger *GYPA* an der Zelloberfläche der Zellen mit reprimierter *FUBP1*-Expression (55 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen (85 %) detektiert. Dieses Niveau wurde bis zum Ende des Versuches nach 17 Tagen gehalten (siehe Abbildung 3.10E).

Der *knock down* von *FUBP1* fiel in den primären HSPCs weniger stark aus als in K562-Zellen. Die Expression von *FUBP1* war aber bis zum Versuchsende deutlich reprimiert. Während die verminderte *FUBP1*-Expression keinen Einfluss auf die Expression des megakaryozytären Markers CD41 an der Zelloberfläche hatte, reichte sie aber aus, um die Menge an *GYPA* an der Zelloberfläche mit fortschreitender Differenzierung um ein Drittel zu reduzieren. Dies legt eine Beteiligung von *FUBP1* an der erythroiden Differenzierung nahe.



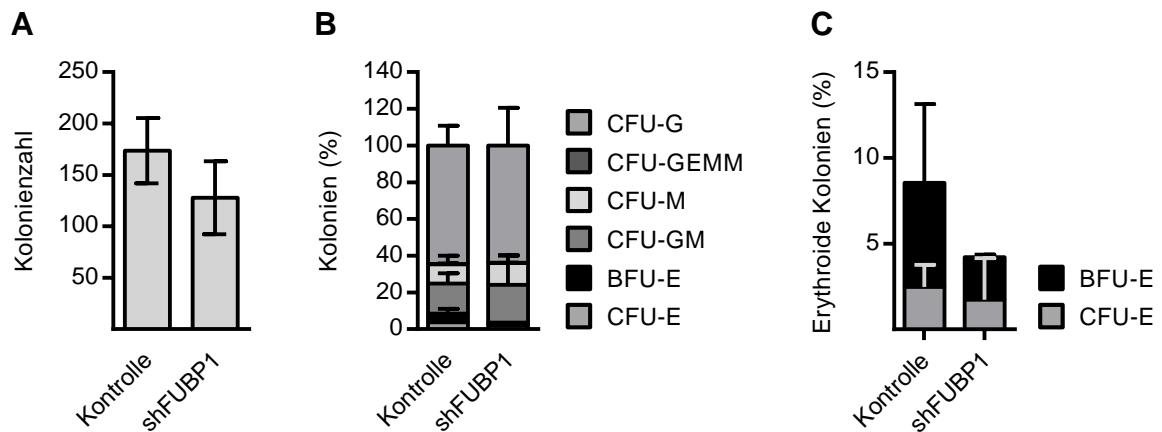
**Abbildung 3.10: Die Expression von GYPA ist nach dem *knock down* von *FUBP1* in  $CD34^+$ -Zellen vermindert.** (A) Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) wurden mit einer gegen *FUBP1* gerichteten shRNA (sh*FUBP1*) transduziert und die transduzierten GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert. Diese Zellen wurden 17 Tage in einem Flüssigmedium kultiviert, welches sowohl erythroide als auch megakaryozytäre Differenzierung zulässt. Die *FUBP1*-Expression wurde durch RT und qPCR bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Menge des megakaryozytären Markers CD41 und des erythroiden Markers GYPA (CD235a) an der Zelloberfläche gemessen. (B) 4 Tage nach der Transduktion war die *FUBP1*-Expression vermindert und (C) war auch am Ende der Differenzierung reprimiert. (D) In der Expression von CD41 an der Zelloberfläche konnte kein Unterschied zwischen den mit sh*FUBP1* transduzierten Zellen und Kontrollzellen bestimmt werden. (E) Die Menge an GYPA lag in den Zellen mit *knock down* deutlich unter der in den Kontrollzellen. Als Referenzgen in der qPCR wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten an.

### 3.1.9 Nach dem *knock down* von *FUBP1* in hämatopoetischen Vorläuferzellen ist die Bildung erythroider Kolonien reduziert

Der Einfluss von *FUBP1* auf die Expression des erythroiden Markers GYPA konnte in HSPCs gezeigt werden. Daher sollte nun untersucht werden, ob *FUBP1* tatsächlich an der Differenzierung beteiligt ist. Dies sollte in einem *colony formation assay*-Experiment in Methylzellulose überprüft werden. Für diesen Versuch wurden  $CD34^+$ -Zellen mit sh*FUBP1* transduziert und die transduzierten GFP-positiven Zellen 4 Tage nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie sortiert. Diese Zellen wurden für 9 bis 12 Tage in Methylzellulose unter Bedingungen kultiviert, welche die Bildung von Kolonien verschiedener Entwicklungslinien erlaubt. Dabei können Kolonien von Granulozyten, Makrophagen, Erythrozyten und ihrer Mischformen am Mikroskop voneinander unterschieden werden. Der Versuch wurde mit  $CD34^+$ -Zellen zweier verschiedener Stammzellspender durchgeführt und die Ergebnisse zusammengefasst.

In der Gesamtzahl an Kolonien konnte kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit *FUBP1-knock down* festgestellt werden (siehe Abbildung 3.11A). Der *knock down* von *FUBP1* führte zu einem tendenziell leicht erhöhten Anteil an Kolonien bildender Einheiten (CFUs, *colony forming units*) von Granulozyten / Makrophagen-Vorläuferzellen (GM; siehe Abbildung 3.11B). Außerdem war der Anteil erythroider Kolonien halbiert (siehe Abbildung 3.11C). Die erythroiden Kolonien konnten frühen (BFU-E, *burst forming units*) und reiferen (CFU-E) erythroiden Vorläuferzellen zugeordnet werden.

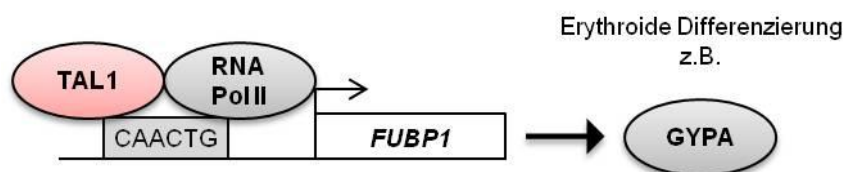
Mit diesem Versuch wurde die Abhängigkeit der Erythropoese von *FUBP1* deutlich demonstriert. Mit reduzierter *FUBP1*-Expression war die Differenzierung in die erythroide Richtung stark vermindert. Eventuell hat *FUBP1* außerdem einen reprimierenden Einfluss auf die Entwicklung von Monoblasten und Myeloblasten, da deren Vorläuferzellen nach dem *knock down* von *FUBP1* vermehrt vorlagen. Dies konnte in diesem Versuch jedoch nicht klar gezeigt werden.



**Abbildung 3.11: Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) bilden nach dem *knock down* von *FUBP1* weniger erythroide Kolonien.** CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einer gegen *FUBP1* gerichteten shRNA (shFUBP1) transduziert und die transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert. Diese Zellen wurden in Methylzellulose-haltigem Medium kultiviert, welches die Differenzierung in verschiedene hämatopoetische Entwicklungslinien erlaubt und die Kolonien am Mikroskop ausgewertet. **(A)** Für die Gesamtzahl der Kolonien wurde kein Unterschied festgestellt. **(B)** Die Vorläuferzellen mit *FUBP1*-*knock down* bildeten tendenziell mehr CFU-GMs aber **(C)** deutlich weniger Kolonien erythroiden Typs. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten an. CFU – Kolonien bildende Einheit, *colony forming unit*; G - Granulozyte; GEMM - multipotente Vorläuferzelle (bildet Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten); M - Makrophage; GM - Granulozyten / Makrophagen-Vorläuferzelle; BFU-E - frühe erythroide Vorläuferzelle, *erythroid burst forming unit*; CFU-E - reifere erythroide Vorläuferzelle.

### 3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Regulation von *FUBP1* durch *TAL1* während der Erythropoese

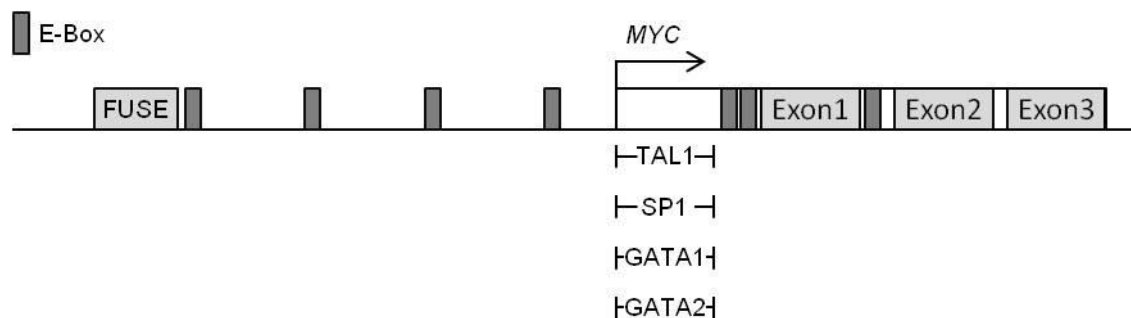
Nach den durchgeführten Versuchen konnte ein Modell für die Regulation von *FUBP1* durch *TAL1* aufgestellt werden (siehe Abbildung 3.12): *FUBP1* und *TAL1* werden in HSPCs und in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie ko-exprimiert. In diesen Zellen besetzt *TAL1* den Promotor von *FUBP1* an einem nahe zum Transkriptionsstart gelegenen E-Box-Motiv. Dieses Motiv wird auch von der RNA-Polymerase II besetzt und vermittelt die Aktivierung des Promotors in Gegenwart von *TAL1* in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie. In verschiedenen Zellsystemen induziert *TAL1* die Expression von *FUBP1*. Durch den *knock down* von *TAL1* in HSPCs wurde die Abhängigkeit der *FUBP1*-Expression von *TAL1* deutlich. Die *FUBP1*-Expression ist in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie notwendig für eine normale *GYPA*-Expression. Ein Einfluss von *FUBP1* auf die Expression des megakaryozytären Differenzierungsmarkers CD41 konnte dagegen nicht gezeigt werden. Mit verminderter *FUBP1*-Expression ist die erythroide Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinträchtigt. Somit wurde die Regulation von *FUBP1* durch *TAL1* aufgezeigt und dass *FUBP1* eine positiv regulierende Rolle während der erythroiden Differenzierung einnimmt.



**Abbildung 3.12: Modell der Regulation von *FUBP1* durch *TAL1* während der erythroiden Differenzierung.** *TAL1* bindet ebenso in dem Bereich um eine nahe am Transkriptionsstart von *FUBP1* (Pfeil) lokalisierte E-Box (CAACTG), wie die RNA-Polymerase II. Dadurch wird die Expression von *FUBP1* aktiviert. *FUBP1* unterstützt seinerseits die erythroide Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Dabei reguliert *FUBP1* die Expression von Glycophorin A (*GYPA*), welches ein wichtiger Bestandteil der Erythrozytenmembran ist.

### 3.2 Die Regulation des FUBP1-Zielgens *MYC*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TAL1 die Expression von *FUBP1* in erythroiden Zellen induziert. FUBP1 seinerseits ist ein Transkriptionsfaktor, der weitere Gene reguliert, wie zum Beispiel das *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*, oft auch *c-MYC* genannt), das ebenfalls ein Transkriptionsfaktor ist (Avigan *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 1994). *MYC* übernimmt eine wichtige Rolle an verschiedenen Punkten in der Hämatopoese. Daher könnte dessen reprimierte Expression in FUBP1-defizienten Zellen der Grund für die oben beobachtete verminderte erythroide Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen sein. Der Promotor von *MYC* weist mehrere E-Boxen auf und mittels ChIP-seq wurde in K562-Zellen eine TAL1-Bindung gezeigt (siehe Abbildung 3.13; Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Außerdem wurde *MYC* bereits als direktes Zielgen von TAL1 identifiziert (Kassouf *et al.*, 2010). Die Regulation von *MYC* sollte daher während der erythroiden Differenzierung unter Beteiligung von FUBP1 und TAL1 untersucht werden, um Hinweise auf den Mechanismus zu erhalten, welcher der verminderten erythroiden Differenzierung in FUBP1-defizienten Zellen zugrunde liegt.



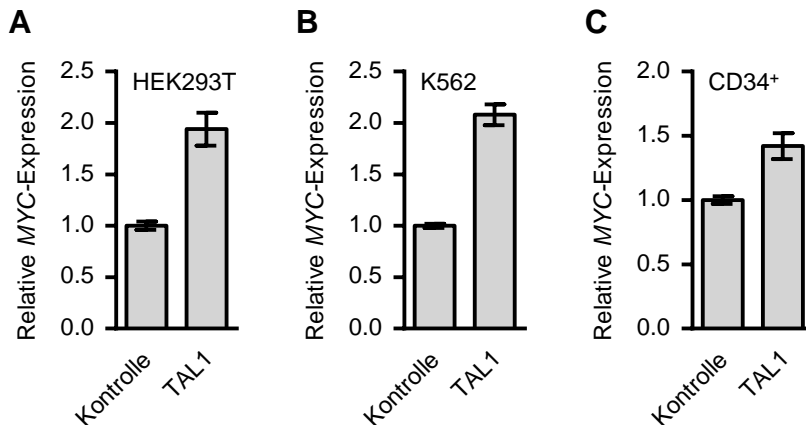
**Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des *MYC*-Promotors.** Auf dem Promotorbereich von *MYC* befindet sich in ca. 1,5 kb Entfernung zum Transkriptionsstart (Pfeil) eine FUSE-Sequenz. Sowohl im Promotorbereich, als auch nach dem Transkriptionsstart befinden sich mehrere E-Boxen (dunkelgraue Boxen), welche potentielle TAL1-Bindestellen darstellen. In der 5'-UTR wurden durch Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) Bindestellen für TAL1, SP1, GATA1 und GATA2 in K562-Zellen identifiziert (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a).

#### 3.2.1 Die Expression von *MYC* wird durch *TAL1* induziert

Da *MYC* ein Zielgen von *TAL1* darstellt, sollte zunächst überprüft werden, ob die Expression von *MYC* durch *TAL1* in den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen beeinflusst wird. Dazu wurde *TAL1* in HEK293T-, K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen überexprimiert und mittels RT und qPCR die Expression von *MYC* ermittelt.



In allen drei Zellsystemen hatte die ektopische Expression von *TAL1* (siehe Abbildung 3.7A-C) auch eine vermehrte Expression von *MYC* zur Folge. Dabei verdoppelte sich die Expression in HEK293T- und K562-Zellen (siehe Abbildung 3.14A-B), während in CD34<sup>+</sup>-Zellen etwa 50 % mehr *MYC* exprimiert wurde (siehe Abbildung 3.14C).

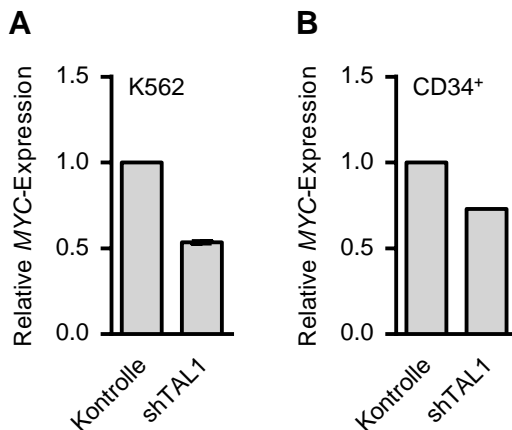


**Abbildung 3.14: Die Expression von *MYC* wird durch die ektopische Expression von *TAL1* in verschiedenen Zellsystemen induziert.** In HEK293T-, K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde ein *TAL1*-Überexpressionsvektor eingebracht und die Expression von *MYC* mittels RT und qPCR gemessen. Durch die Überexpression von *TAL1* verdoppelte sich die *MYC*-Expression in (A) HEK293T- und (B) K562-Zellen und (C) stieg in hämatopoetischen Vorläuferzellen um die Hälfte an. Als Referenzgen wurde *TBP* in HEK293T-Zellen und *GAPDH* in K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an.

### 3.2.2 Die Expression des FUBP1-Zielgens *MYC* wird nach dem *knock down* von *TAL1* reprimiert

*TAL1* induzierte die Expression von *MYC*, deshalb sollte geklärt werden, ob umgekehrt die Expression von *MYC* bei einem *knock down* von *TAL1* beeinflusst wird. Außerdem sollten durch den Überexpressionsvektor verursachte Artefakte ausgeschlossen werden. Für diesen Versuch wurden K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen mit einer gegen *TAL1* gerichteten shRNA transduziert und die Expression von *MYC* gemessen.

Nach dem *knock down* von *TAL1* (siehe Abbildung 3.8A; D) wurde nur noch die halbe Menge an *MYC* in K562-Zellen detektiert (siehe Abbildung 3.15A). In hämatopoetischen Vorläuferzellen war mit 73 % ebenfalls weniger *MYC* vorhanden (siehe Abbildung 3.15B). Die Abhängigkeit der *MYC*-Expression von *TAL1* war also besonders in den Zellen erythroider Herkunft zu sehen.

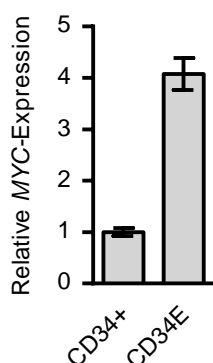


**Abbildung 3.15: Die Expression von *MYC* ist nach dem *knock down* von *TAL1* reprimiert.** K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einer gegen *TAL1* gerichteten shRNA (shTAL1) transduziert und die *MYC* Expression anschließend durch RT und qPCR ermittelt. Sowohl in (A) K562- als auch in (B) CD34<sup>+</sup>-Zellen hatte der *knock down* von *TAL1* eine verminderte *MYC*-Expression zur Folge. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten an. Da die Werte der Experimente sehr eng beieinander liegen, fallen die Fehlerbalken sehr gering aus.

### 3.2.3 *MYC* wird vermehrt in erythroid differenzierten Zellen exprimiert

*MYC* wurde bereits mit erythroider Differenzierung in Zusammenhang gebracht (Delgado *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2009), und in den vorangegangenen Versuchen wurde eine von *TAL1* abhängige Expression von *MYC* besonders in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie gezeigt (siehe Abbildung 3.15A). Nun sollte untersucht werden, ob *MYC* während der erythroiden Differenzierung mit dem für die erythroide Entwicklung essentiellen Transkriptionsfaktor *TAL1* ko-exprimiert wird (siehe Abbildung 3.2E). Dazu wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen mit EPO in die erythroide Richtung differenziert und die Expression von *MYC* mittels RT und anschließender qPCR gemessen.

Die Expression von *MYC* stieg während der erythroiden Differenzierung um das 4-fache an im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 3.16). Dies bestätigt die Rolle von *MYC* während der Erythropoese. Zudem liefert die Ko-Expression von *MYC* und *TAL1* während der Erythropoese einen Hinweis auf eine mögliche regulative Verbindung.



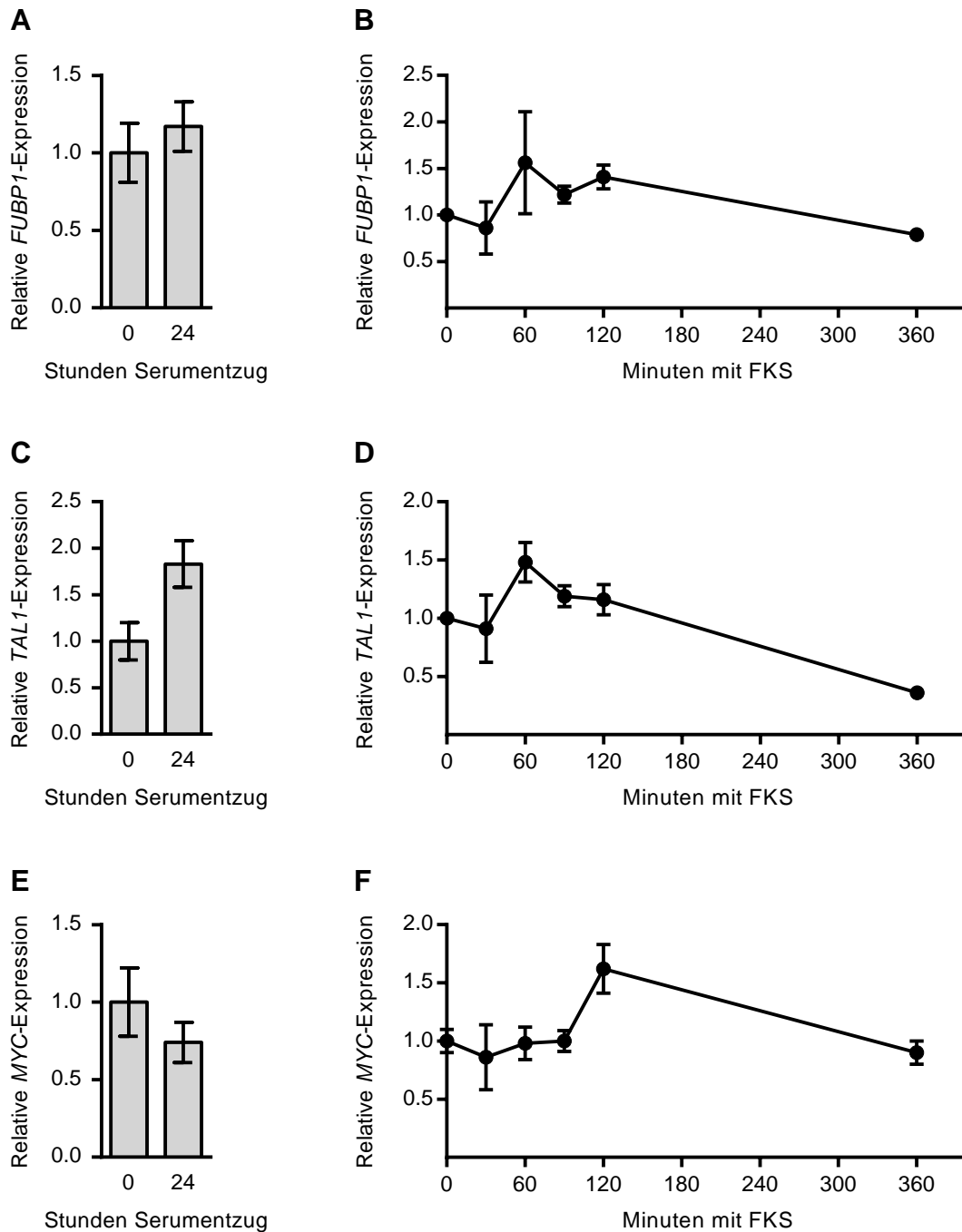
**Abbildung 3.16: Die Expression von *MYC* während der erythroiden Differenzierung.** CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen wurden zur erythroiden Differenzierung mit Erythropoetin (EPO) behandelt (CD34E). Mittels RT und qPCR wurde die *MYC*-Expression analysiert und zeigte einen starken Anstieg während des Differenzierungsprozess. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an.

### 3.2.4 Nach Zellsynchronisation findet die *MYC*-Expression zeitlich verzögert zu der von *FUBP1* und *TAL1* statt

Es konnte gezeigt werden, dass *MYC* und *TAL1* in verschiedenen Zellsystemen (Nierenzellen, erythroleukämische Zellen und HSPCs) ko-exprimiert wurden und die *MYC*-Expression abhängig von *TAL1* war. Als nächstes sollte die Kinetik der Expression von *MYC*, *FUBP1* und *TAL1* nach Zellsynchronisation durch G1-Phasenarrest mittels Serumentzug-Serumstimulierung untersucht werden (Griffin, 1976; Langan *et al.*, 2011). Wird den Zellen nach einem Serumentzug wieder Serum zugegeben, findet ein Anstieg in der *MYC*-Expression statt. Das zeitliche Expressionsmuster der drei Transkriptionsfaktoren nach dem G1-Phasenarrest kann Hinweise auf eine gegenseitige Regulation liefern. Der Versuch wurde in K562-Zellen durchgeführt, die zum Arrest in der G1-Phase 24 Stunden ohne fetales Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Danach wurden die Zellen mit 10 % FKS stimuliert und die Expression der Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten (0; 30; 60; 90; 120; 360 Minuten) nach Serumstimulation mittels RT und qPCR gemessen.

Für die Expression von *FUBP1* wurde nach 24 Stunden Kultivierung ohne FKS kein Unterschied festgestellt (siehe Abbildung 3.17A). 60 Minuten nach der Serumstimulation wurde eine Erhöhung der Menge von *FUBP1* auf das 1,5-fache detektiert, welche 360 Minuten nach der Serumstimulation wieder in den Bereich des normalen Niveaus abgefallen war (siehe Abbildung 3.17B). *TAL1* war nach dem Serumentzug etwa um das Doppelte herauf reguliert (siehe Abbildung 3.17C) und zeigte ebenfalls einen Höhepunkt auf das 1,5-fache 60 Minuten nach Serumstimulation. Das Expressionsniveau von *TAL1* fiel 360 Minuten nach der Serumstimulation in den Bereich des normalen Niveaus ab (siehe Abbildung 3.17D). Der Serumentzug hatte keine messbare Veränderung der *MYC*-Expression zur Folge (siehe Abbildung 3.17E). Nach Serumstimulation war auch für *MYC* ein Höhepunkt in der Expression zu detektieren, allerdings erst 120 Minuten danach. Das normale Expressionsniveau wurde auch hier 360 Minuten nach der Stimulation wieder erreicht (siehe Abbildung 3.17F).

Nur *TAL1* war durch den Serumentzug beeinflusst und herauf reguliert. Nach dem G1-Phasenarrest, der durch den Serumentzug ausgelöst wurde, zeigten alle drei Transkriptionsfaktoren eine Spitze in der Expression. Diese lag allerdings zeitlich versetzt, so hatten *FUBP1* und *TAL1* zum gleichen Zeitpunkt nach 60 Minuten ihren Höchstwert, während *MYC* seinen Höhepunkt eine Stunde später erreichte. Die zeitlich versetzte Expression könnte ein Hinweis auf die Aktivierung von *MYC* durch *FUBP1* und möglicherweise zusätzlich durch *TAL1* sein.



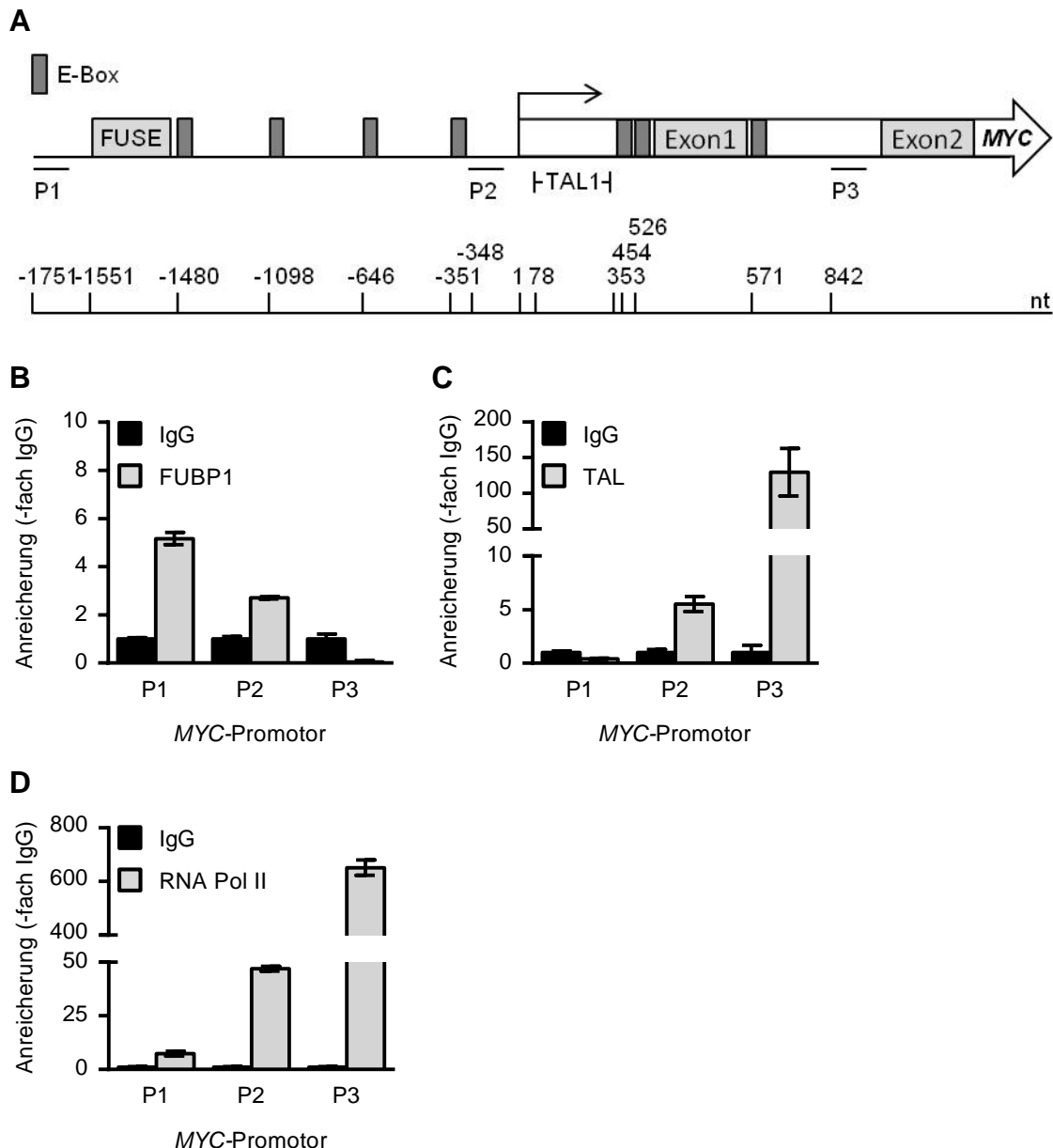
**Abbildung 3.17: Expression von *TAL1*, *FUBP1* und *MYC* nach Zellsynchronisation in K562-Zellen.** Die Zellen wurden zur Synchronisation durch G1-Phasenarrest 24 Stunden ohne FKS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Serum stimuliert und die Expression der Transkriptionsfaktoren durch RT und qPCR gemessen. **(A)** Die Expression von *FUBP1* war durch den Serumentzug nicht beeinflusst und **(B)** erreichte 60 Minuten nach der Stimulation ihren Höhepunkt. **(C)** *TAL1* wurde nach dem Serumentzug etwa verdoppelt exprimiert und **(D)** hatte nach der Serumstimulation seinen Höhepunkt ebenfalls nach 60 Minuten. **(E)** *MYC* lag nach dem Serumentzug in unveränderter Menge vor, **(F)** erreichte seine Expressionsspitze allerdings zeitlich verzögert zu *FUBP1* und *TAL1*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei Replikaten an. FKS - Fetales Kälberserum.

### 3.2.5 Der *MYC*-Promotor wird in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie von FUBP1 und TAL1 besetzt

*MYC* wurde nach Zellsynchronisation verzögert zu *FUBP1* und *TAL1* exprimiert. Nun sollte geklärt werden, welcher dieser beiden Transkriptionsfaktoren den Promotor von *MYC* besetzt. Dazu wurden ChIP-Lysate aus unbehandelten K562-Zellen hergestellt und ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen FUBP1, TAL1 und die RNA-Polymerase II durchgeführt. Das präzipitierte Chromatin wurde mit verschiedenen Primerpaaren in einer qPCR analysiert. Die Primerpaare amplifizierten drei Regionen von *MYC* und dessen Promotor mit einem Abstand von 1,2 bzw. 1,4 kb zueinander. Der Promotor von *MYC* weist eine FUSE-Sequenz ca. 1,5 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt auf. In direkter Nähe dazu befindet sich eine E-Box. Dies war die Region für P1. 0,3 kb vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine weitere E-Box, die von dem Primerpaar P2 flankiert wurde. In dieser Region befindet sich auch eine potentielle durch ein Chip-seq-Experiment ermittelte TAL1-Bindestelle (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Fünf weitere E-Boxen sind über die Sequenz von *MYC* und dessen Promotor verteilt. Drei dieser E-Boxen befinden sich nahe um den Translationsstart und sind ca. 0,3 kb von der durch P3 abgedeckten Region entfernt lokalisiert (siehe Abbildung 3.18A).

Für FUBP1 wurde die stärkste Anreicherung mit dem 5-fachen im Vergleich zu IgG im Bereich um die FUSE-Sequenz detektiert, die mit zunehmender Entfernung stark abnahm (siehe Abbildung 3.18B). TAL1 zeigte mit der 129-fachen Menge an IgG die höchste Anreicherung in der Region, welche sich nahe zu den drei E-Boxen um Exon 1 befindet. Der Bereich um die E-Box, welche 0,35 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert ist, zeigte mit der 5,5-fachen Menge an IgG ebenfalls eine Anreicherung von TAL1 (siehe Abbildung 3.18C). Die RNA-Polymerase II lag mit der 46-fachen (P2) bzw. 651-fachen (P3) Menge an IgG deutlich angereichert in der *MYC*-Promotorregion bis in das erste Intron hinein vor (siehe Abbildung 3.18D).

Der Promotor von *MYC* wurde von FUBP1 und TAL1 besetzt. Die Anreicherung von FUBP1 war am stärksten in dem Bereich, in welchem sich die FUSE-Sequenz mit einer E-Box befindet. TAL1 war vor allem nahe zu drei eng beieinander lokalisierten E-Boxen verstärkt vorhanden. Die Anreicherung der RNA-Polymerase II war besonders stark in der Nähe zum Transkriptionsstart. Somit wurde gezeigt, dass sowohl FUBP1 als auch TAL1 auf dem *MYC*-Promotor vorhanden sind und sich dieser wahrscheinlich in einem aktiven Zustand befindet, was die Anwesenheit der RNA-Polymerase II vermuten lässt.

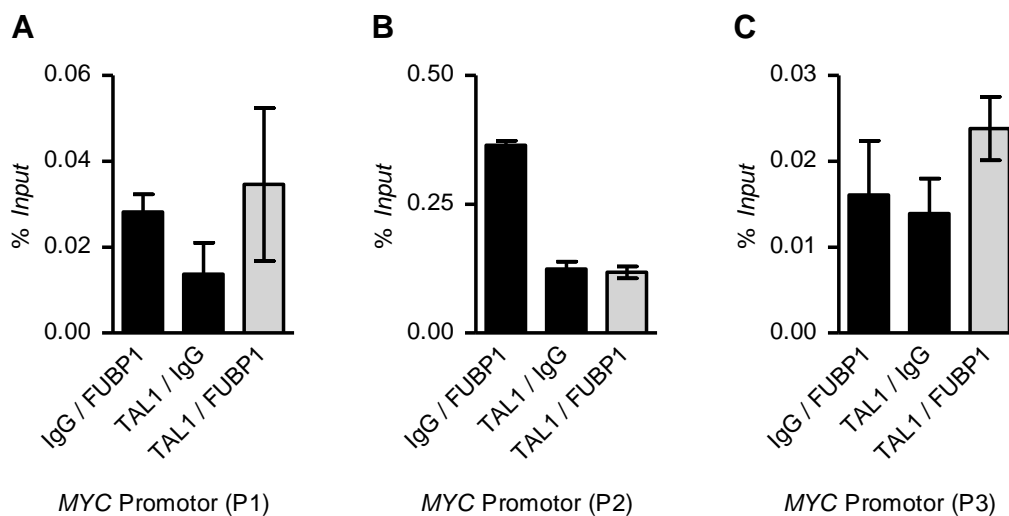


**Abbildung 3.18: Vereinfachte Übersicht über den *MYC*-Promotor und dessen Besetzung mit FUBP1 und TAL1 in K562-Zellen.** (A) Der Promotorbereich von *MYC* weist eine FUSE-Sequenz ca. 1,5 kb vom Transkriptionsstart (Pfeil) entfernt auf. In direkter Nähe dazu befindet sich als TAL1-Bindemotiv (CANNTG) eine E-Box (graue Box). Eine weitere E-Box befindet sich ca. 0,35 kb vom Transkriptionsstart stromaufwärts. Dazwischen befinden sich ebenfalls zwei E-Box-Motive, außerdem sind um den Translationsstart um den Bereich von Exon 1 noch drei E-Boxen zu finden. In der 5'UTR Region ist eine durch eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung (ChIP-seq) ermittelte Sequenz vorhanden, auf der TAL1 binden soll (2012; Wang *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2013a). Primerpaare, welche verschiedene Regionen von *MYC* und dessen Promotorregion amplifizieren, wurden in einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eingesetzt (P1-P3). (B) In einem ChIP-Experiment mit einem Antikörper gegen FUBP1 war eine Anreicherung von FUBP1 besonders um die FUSE-Sequenz vorhanden. (C) TAL1 besetzte vor allem die Region um die 0,35 kb vom Transkriptionsstart gelegene E-Box, sowie die Region um den Translationsstart, in welcher drei E-Boxen vorhanden sind. (D) Die RNA-Polymerase II war vor allem in den näher zum Transkriptionsstart hin gelegenen Bereichen angereichert. Der Wert für die IgG-Kontrolle wurde als 1 festgesetzt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an. nt –Nukleotide.

### 3.2.6 FUBP1 und TAL1 werden nicht zusammen auf dem *MYC*-Promotor detektiert

Da nicht nur FUBP1, sondern auch TAL1 auf dem *MYC*-Promotor detektiert wurde, sollte untersucht werden, ob die beiden Transkriptionsfaktoren den Promotor gemeinsam besetzen. Obwohl beide Transkriptionsfaktoren den Promotorbereich in unterschiedlichen Regionen binden, ist dies möglich, da FUBP1 an die FUSE-Sequenz gebunden mittels GTFIIH über eine DNA-Schleife am Transkriptionsstart von *MYC* bindet (siehe Abbildung 2.12; Liu *et al.*, 2006). Der Nachweis sollte mit einem sequentiellen ChIP-Experiment (ChIP-ReChIP) mit Lysaten aus unbehandelten K562-Zellen erfolgen. Die eingesetzten Antikörper waren gegen FUBP1 und TAL1 und zur Negativkontrolle gegen IgG gerichtet. In der qPCR zur Analyse des präzipitierten Chromatins wurden drei Primerpaare eingesetzt, welche verschiedene Stellen von *MYC* und dessen Promotorbereich amplifizierten (siehe Abbildung 3.18A).

Für keinen der Promotorbereiche von *MYC* wurde eine Anreicherung von FUBP1 und TAL1 gemeinsam gemessen (siehe Abbildung 3.19A-C). Daher kann die gemeinsame Besetzung des *MYC*-Promotors in K562-Zellen mit diesen beiden Transkriptionsfaktoren nicht bestätigt werden. Es ist allerdings möglich, dass dies mit einer Optimierung der Versuchsbedingungen bzw. in HSPCs gezeigt werden kann.



**Abbildung 3.19: FUBP1 und TAL1 besetzen den *MYC*-Promotor von K562-Zellen nicht gemeinsam. (A-C)** In einer sequentiellen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-ReChIP) wurden Antikörper gegen FUBP1 und TAL1 zur Präzipitation von Chromatin aus dem Lysat unbehandelter K562-Zellen verwendet. Keine der untersuchten Regionen des *MYC*-Promotors (P1-P3) zeigte eine gemeinsame Anreicherung von FUBP1 und TAL1. Dargestellt ist die prozentuale Anreicherung im Vergleich mit dem Input. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an.

### 3.2.7 Der *MYC*-Promotor wird durch FUBP1 und TAL1 reguliert

FUBP1 und TAL1 besetzten jeweils den *MYC*-Promotor in K562-Zellen. Daher sollte nun untersucht werden, ob diese Transkriptionsfaktoren auch die Aktivität des *MYC*-Promotors regulieren. Dies wurde mit einer Promotorstudie analysiert. Eingesetzt wurde ein Luciferasevektor, welcher die Sequenz 2 kb stromaufwärts des Translationsstarts von *MYC* und damit sowohl die FUSE-Sequenz als auch die benachbarte E-Box enthält (*MYC* -2.0). Außerdem lag dieses Konstrukt als Deletionsmutante vor, in welcher die FUSE-Sequenz nicht mehr vorhanden war (*MYC* -2.0 $\Delta$ FUSE). Zunächst wurden die Konstrukte zur Überprüfung ihrer Funktionalität in HEK293T- und K562-Zellen transfiziert. Anschließend wurden beide Konstrukte jeweils mit shFUBP1 bzw. shTAL1 in K562-Zellen ko-transfiziert, um den Einfluss des jeweiligen Transkriptionsfaktors auf die Aktivität des *MYC*-Promotors zu analysieren.

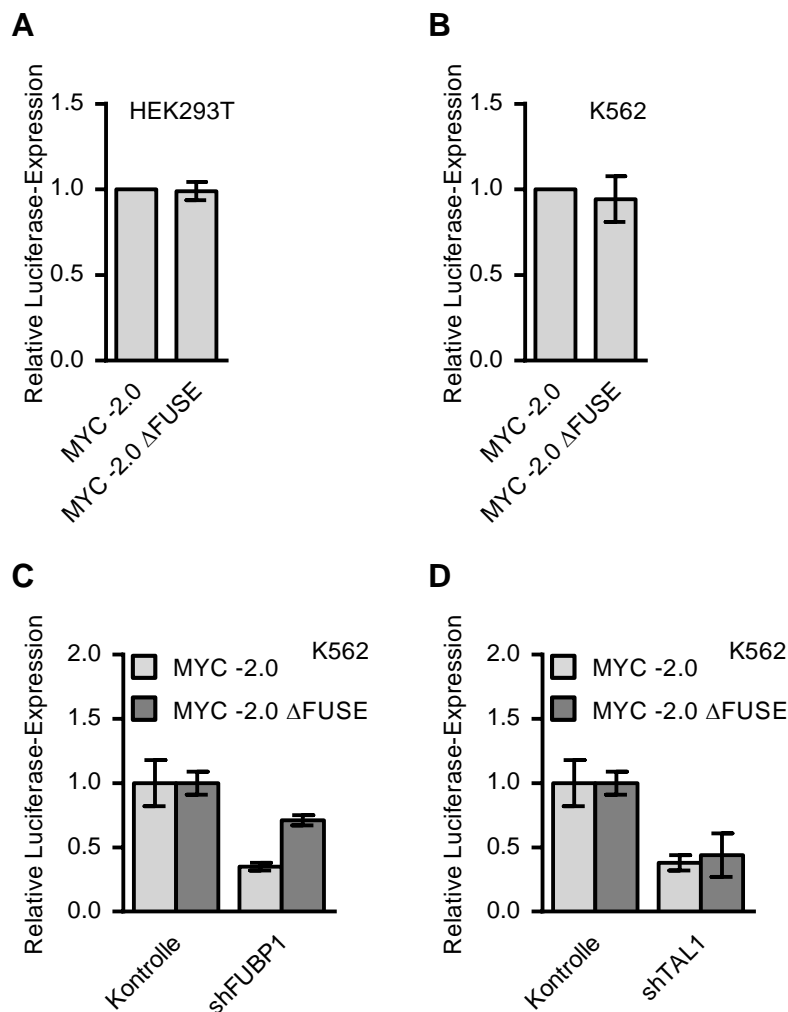
Die beiden Luciferasekonstrukte des *MYC*-Promotors unterschieden sich in ihrer Aktivität nicht voneinander (siehe Abbildung 3.20A-B). In K562-Zellen führte die Ko-Transfektion von shFUBP1 zu einer auf 36 % reduzierten Aktivität des *MYC*-Promotorkonstrukts im Vergleich zur Kontrolle. Die Aktivität wurde mit dem Wegfall der FUSE-Sequenz wieder auf 71 % erhöht (siehe Abbildung 3.20C). In Anwesenheit von shTAL1 wurde für beide *MYC*-Promotorkonstrukte eine Reprimierung der Aktivität auf ca. 40 % gemessen (siehe Abbildung 3.20D).

Die Expression der *MYC*-Promotorkonstrukte war in beiden untersuchten Zelllinien äquivalent zueinander, unabhängig davon, ob die FUSE-Sequenz deletiert war. Daher konnte es für die Ko-Transfektion mit den shRNAs eingesetzt werden. Hier zeigte sich, dass der *MYC*-Promotor durch FUBP1 über die FUSE-Sequenz aktiviert wird. TAL1 hat ebenfalls eine positiv regulierende Wirkung auf den *MYC*-Promotor, welche unabhängig von der FUSE-Sequenz ist. Durch diesen Versuch wurde die Abhängigkeit der Aktivierung von *MYC* durch TAL1 demonstriert.

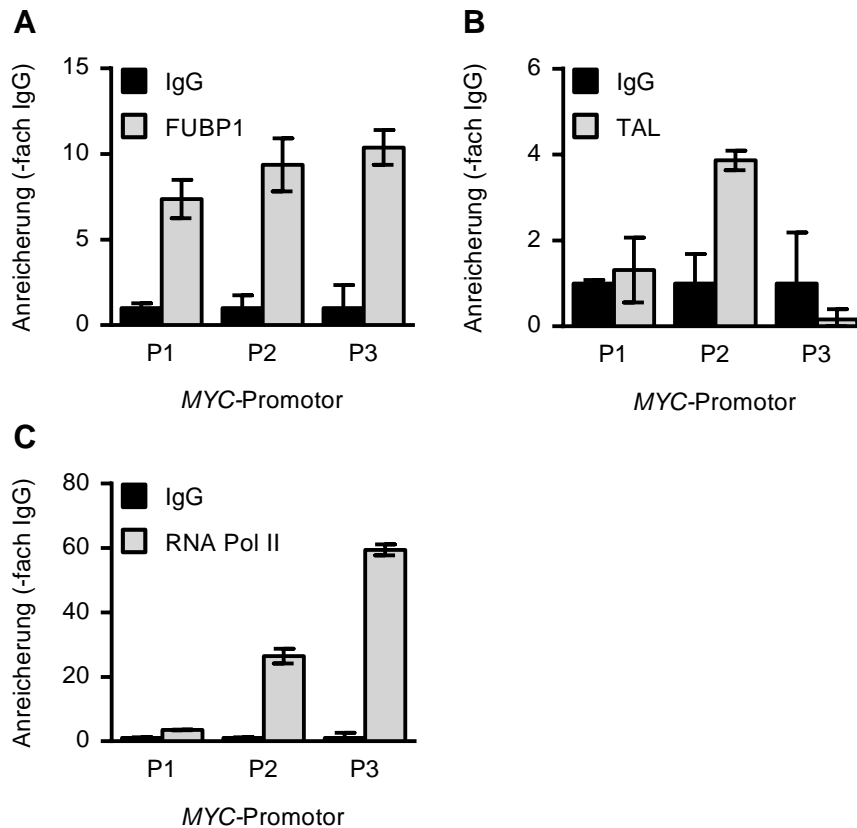
### 3.2.8 FUBP1 und TAL1 sind auf dem *MYC*-Promotor von hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden

Für Zellen der erythroiden Entwicklungslinie wurden sowohl FUBP1 als auch TAL1 auf dem Promotor von *MYC* nachgewiesen. Außerdem ist die *MYC*-Expression von beiden Transkriptionsfaktoren abhängig. Um die Regulation von *MYC* in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu untersuchen, sollte durch ein ChIP-Experiment geklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren in diesen Zellen den *MYC*-Promotor besetzen. Dafür wurden Antikörper gegen FUBP1 und TAL1 eingesetzt sowie zur Kontrolle gegen die RNA-Polymerase II.





**Abbildung 3.20: Aktivität des *MYC*-Promotors und dessen Deletionsmutante in HEK293T- und K562-Zellen.** In einer Promotoranalyse wurde der Promotorbereich von *MYC*, welcher die FUSE-Sequenz enthielt, mit einem Luciferase-Reportergen fusioniert (*MYC* -2.0). In einem weiteren Konstrukt war die FUSE-Sequenz deletiert (*MYC* -2.0ΔFUSE). Wurden die Konstrukte in **(A)** HEK293T- oder **(B)** K562-Zellen transfiziert, war kein Unterschied in der Aktivität der beiden Konstrukte zu erkennen. In K562-Zellen wurde zusätzlich zum *MYC*-Promotorkonstrukt jeweils eine gegen *FUBP1* (shFUBP1) bzw. *TAL1* (shTAL1) gerichtete shRNA, sowie eine *scrambled* shRNA zur Kontrolle co-transfiziert. **(C)** Mit eingeschränkter *FUBP1*-Expression war die Aktivität des *MYC*-Promotors stark reduziert. Dieser Effekt wurde durch die Deletion der FUSE-Sequenz abgemildert. **(D)** Die verminderte *TAL1*-Expression hatte eine stark reprimierte Promotoraktivität von *MYC* zur Folge, die unabhängig von der FUSE-Sequenz war. (A-B) Die Aktivität des Volllängekonstrukts wurde als 1 festgelegt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten an. (C-D) Die Aktivität der Konstrukte in den Kontrollzellen wurde als 1 festgelegt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von jeweils vier Replikaten an.



**Abbildung 3.21: Besetzung des *MYC*-Promotors mit FUBP1, TAL1 und der RNA-Polymerase II in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.** Lysate von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit Antikörpern gegen FUBP1, TAL1 und der RNA-Polymerase II in eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eingesetzt. Die Analyse des präzipitierten Chromatins erfolgte mit Primern, welche unterschiedliche Regionen von *MYC* und dessen Promotor amplifizierten (P1-P3). **(A)** FUBP1 lag in allem analysierten Regionen des *MYC*-Promotors angereichert vor. **(B)** TAL1 war vor allem im Bereich um den Transkriptionsstart (P2) angereichert. **(C)** Die Besetzung des *MYC*-Promotors mit der RNA-Polymerase II stieg in den näher zum Transkriptions- (P2) und Translationsstart (P3) gelegenen Regionen an. Der Wert für die IgG-Kontrolle wurde als 1 festgesetzt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an.

FUBP1 wurde mit der 7- bis 10-fachen Menge an IgG angereichert auf *MYC* und dessen Promotorbereich detektiert (siehe Abbildung 3.21A). Die TAL1-Bindung war im Bereich der 0,35 kb stromaufwärts lokalisierten E-Box mit der 4-fachen Menge an IgG am höchsten (siehe Abbildung 3.21B). Die RNA-Polymerase II war mit der 26- bzw. 59-fachen Menge an IgG um den Transkriptions- und Translationsstart herum am stärksten angereichert. (siehe Abbildung 3.21C).

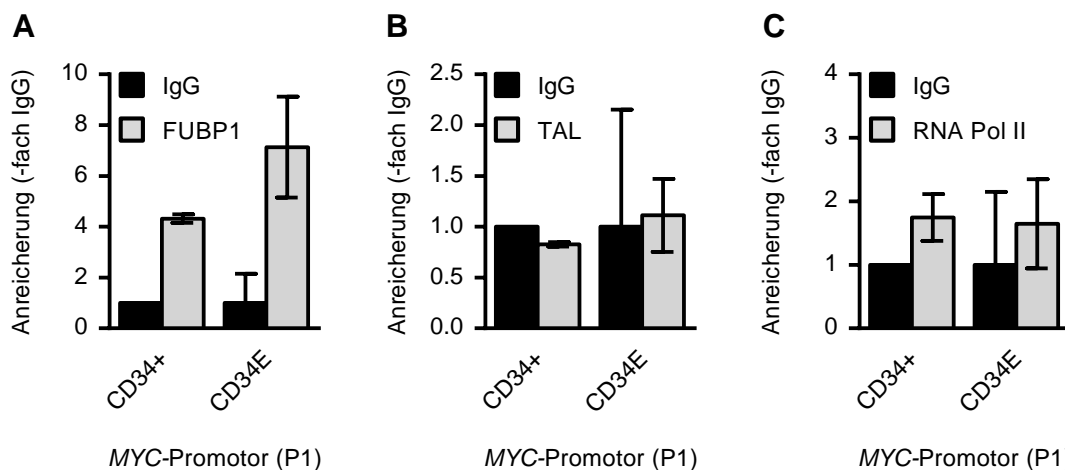
In HSPCs war der *MYC*-Promotor durch FUBP1 und TAL1 besetzt. Außerdem implizierte das Vorhandensein der RNA-Polymerase II einen aktiven Genstatus.

### 3.2.9 Der *MYC*-Promotor wird während der erythroiden Differenzierung vermehrt von FUBP1 besetzt

In unbehandelten hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden FUBP1 und TAL1 auf dem *MYC*-Promotor nachgewiesen. Alle drei Transkriptionsfaktoren wurden während der erythroiden Differenzierung vermehrt exprimiert. Nun sollte untersucht werden, ob sich die Besetzung des *MYC*-Promotors mit FUBP1 während der erythroiden Differenzierung verändert. Dies wurde mit einem ChIP-Experiment mit Lysaten EPO-stimulierter CD34<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Präzipitiert wurde mit Antikörpern gegen FUBP1, TAL1 und die RNA-Polymerase II. Zur Analyse des Chromatins wurde das Primerpaar eingesetzt, welches die Region um die FUSE-Sequenz und die nahebei gelegene E-Box amplifiziert (P1), da hier die höchste Anreicherung für FUBP1 detektiert worden war.

Mit der 7-fachen Menge an IgG war mehr FUBP1 auf dem *MYC*-Promotor der erythroid differenzierten Zellen vorhanden als in den unbehandelten Zellen mit der 4-fachen Menge an IgG (siehe Abbildung 3.22A). Für TAL1 und die RNA-Polymerase II ließ sich in diesem Bereich keine Anreicherung auf dem Promotor feststellen (siehe Abbildung 3.22B-C).

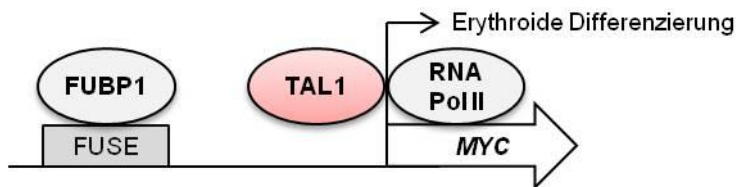
Nur FUBP1 wurde wie erwartet auf dem *MYC*-Promotor im Bereich um die FUSE-Sequenz nachgewiesen und war in erythroid differenzierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermehrt angereichert. TAL1 und die RNA-Polymerase II wurden in dieser Region der mit EPO-stimulierten Zellen nicht nachgewiesen, was zunächst gegen die Bildung einer DNA-Schleife unter der Beteiligung von TAL1 spricht.



**Abbildung 3.22: Besetzung des *MYC* Promotors mit FUBP1, TAL1 und der RNA-Polymerase II in erythroid differenzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen im Bereich der FUSE-Sequenz.** Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen wurden mit EPO in die erythroide Richtung differenziert. Lysate dieser Zellen wurden in einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen FUBP1, TAL1 und die RNA-Polymerase II eingesetzt. Die Analyse des präzipitierten Chromatins erfolgte mit einem Primerpaar, welches die Region um die FUSE-Sequenz amplifiziert (P1). **(A)** Die Anreicherung von FUBP1 auf dem *MYC*-Promotor war während der erythroiden Differenzierung beinahe verdoppelt. **(B)** TAL1 und **(C)** die RNA-Polymerase II wurden in dieser Region nicht nachgewiesen. Der Wert für die IgG-Kontrolle wurde als 1 festgesetzt und die anderen Werte abhängig dazu berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei Replikaten an.

### 3.2.10 Zusammenfassung zur Regulation von *MYC* während der erythroiden Differenzierung

Durch die ektopische Expression von *TAL1* wird die *MYC*-Expression induziert. Umgekehrt ist nach einem *knock down* von *TAL1* die Expression von *MYC* vermindert. Ähnlich der Expression von *FUBP1* und *TAL1* steigt die *MYC*-Expression in HSPCs während der erythroiden Differenzierung stark an. Der *MYC*-Promotor wird in Zellen der erythroiden Entwicklungslinie von *FUBP1* und *TAL1* besetzt und positiv reguliert, allerdings konnte eine gleichzeitige Besetzung durch beide Transkriptionsfaktoren nicht nachgewiesen werden. *FUBP1* besetzt den *MYC*-Promotor auch in hämatopoetischen Vorläuferzellen und wird während der erythroiden Differenzierung weiter angereichert (siehe Abbildung 3.23). Somit ist während der Erythropoese für *MYC* eine Regulation durch *FUBP1* wahrscheinlich, wobei *FUBP1* seinerseits durch *TAL1* reguliert wird. Außerdem wird *MYC* als Zielgen von *TAL1* in den erythroiden K562-Zellen bestätigt.



**Abbildung 3.23: Modell der Regulation von *MYC* durch *FUBP1* während der erythroiden Differenzierung.** *FUBP1* bindet an die *FUSE*-Sequenz in der Promotorregion von *MYC*. Im Promotorbereich von *MYC* liegen außerdem *TAL1* und die RNA-Polymerase II angereichert vor. In K562-Zellen ist die Aktivität des *MYC*-Promotors sowohl von *FUBP1* als auch von *TAL1* abhängig. Werden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) mittels Erythropoetin (EPO) erythroid differenziert, verstärkt sich die Besetzung des *MYC*-Promotors mit *FUBP1* und die *MYC*-Expression steigt an.

## 4 Diskussion

Im hämatopoetischen System ist der Transkriptionsfaktor *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* (TAL1) als Masterregulator auf verschiedenen Ebenen von zentraler Bedeutung (Lecuyer *et al.*, 2004). So kann die definitive erythroid-megakaryozytäre Differenzierung ohne TAL1 nicht ablaufen, da die erythroiden und megakaryozytären Vorläuferzellen ohne TAL1 nicht mehr gebildet werden (Hall *et al.*, 2003). Die Bedeutung von TAL1 spiegelt sich auch in dessen Rolle in Zusammenhang mit der Entstehung von akuten lymphatischen T-Zellleukämien (T-ALL) wieder. Zudem ist die Prognose der Therapie einer mit TAL1 assoziierten T-ALL schlechter, als die einer T-ALL, welche durch andere Onkogene ausgelöst wurde (Ferrando *et al.*, 2002). Seine Wirkung übt TAL1 durch die Rekrutierung von Ko-Faktoren aus, so dass sich sowohl aktivierende als auch reprimierende Multiproteinkomplexe bilden können (Kerenyi *et al.*, 2010; Latchman, 1993). Das Konsensusmotiv für die TAL1-Bindung (Aronheim *et al.*, 1991) ist auch im Promotorbereich des *far upstream element-binding protein 1* (FUBP1) vorhanden. Dieser wichtige transkriptionelle Regulator wurde jedoch bisher noch nicht mit Differenzierung im hämatopoetischen System in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurde die Regulation von *FUBP1* durch TAL1, sowie die Beteiligung von FUBP1 an der erythroiden Differenzierung gezeigt. Außerdem wurde die Regulation des FUBP1-Zielgens *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*, oft auch *c-MYC* genannt) im Kontext der erythroiden Differenzierung untersucht.

### 4.1 *FUBP1* ist ein neues Zielgen von TAL1

#### 4.1.1 TAL1 bindet den *FUBP1*-Promotor an einer E-Box

TAL1 reguliert vor allem Gene, die mit der Hämatopoese assoziiert sind und dort oftmals auch eine Schlüsselfunktion besitzen (siehe 1.2.5 Zielgene von TAL1). Ihnen allen ist ein E-Box-Motiv (CANNTG) im Promotorbereich (und anderen regulatorischen Bereichen) gemeinsam, über das die TAL1-Bindung erfolgt (Aronheim *et al.*, 1991). Der Promotorbereich von *FUBP1* weist zwei E-Boxen, sowie eine weitere in der 5'-UTR auf, so dass hier die molekularen Bedingungen für eine TAL1-Bindung gegeben sind. Zusätzlich ähnelt das Expressionsmuster von *FUBP1* dem von *TAL1* in erythroleukämischen und in unbehandelten sowie erythroid differenzierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs; siehe Abbildung 3.1B; Abbildung 3.2E). Der Transkriptionsfaktor TAL1 ist essentiell an eben jenen Prozessen beteiligt, die bisher in der Literatur auch mit FUBP1 in Verbindung gebracht wurden. Dies betrifft vor allem die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und zusätzlich dazu wird auch die Erythropoese durch TAL1 gesteuert (Hall *et al.*, 2005;

Rojas-Sutterlin *et al.*, 2014). Somit könnte diese mögliche funktionelle Überschneidung ein weiterer Hinweis auf einen regulativen Zusammenhang sein.

Sowohl in erythroleukämischen Zellen, als auch in erythroid differenzierten hämatopoetischen HSPCs wurde eine Anreicherung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor gemessen. Diese war besonders im Bereich der nächsten stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisierten E-Box erhöht (siehe Abbildung 3.4A). Diese Region stimmt mit der TAL1-Bindestelle überein, die in K562-Zellen durch eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) ermittelt wurde (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Dagegen wurde weder in unbehandelten noch in megakaryozytär differenzierten HSPCs eine Anreicherung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor detektiert (siehe Abbildung 3.5A). Diese Beobachtung, und dass die Expression von TAL1 vor allem in HSCs und den erythroid-megakaryozytären Entwicklungslinien hoch ist (Hall *et al.*, 2005; Rojas-Sutterlin *et al.*, 2014), macht die Regulierung von *FUBP1* durch TAL1 in der erythroiden Entwicklungslinie wahrscheinlich, während sie eine Regulation in der megakaryozytären Entwicklungslinie vorerst ausschließt.

#### **4.1.2 *FUBP1* wird durch TAL1 aktiviert**

Die Wirkungsweise von TAL1 beruht auf der Rekrutierung von Interaktionspartnern zu einem Proteinkomplex. Ob dieser aktivierend oder reprimierend auf Zielgene wirkt, hängt von dessen genauer Zusammensetzung ab (Lecuyer *et al.*, 2004). Daher ist eine TAL1-Bindung auf einem Promotorbereich nicht gleichbedeutend mit einer Aktivierung des entsprechenden Gens, und es wurde die Wirkungsweise von TAL1 auf die *FUBP1*-Expression untersucht.

Ein Indiz für einen aktiven Genstatus von *FUBP1* in der erythroiden Entwicklungslinie in Zusammenhang mit TAL1 stellt das Vorhandensein der RNA-Polymerase II auf dem *FUBP1*-Promotor dar, wobei die Regionen mit der höchsten Anreicherung denen der höchsten TAL1-Anreicherung entsprechen. Die Region mit der höchsten Anreicherung von TAL1 und der RNA-Polymerase II weist in K562-Zellen auch eine sehr starke Acetylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27Ac) auf (ENCODE, 2012). Diese Histonmodifikation ist ebenfalls ein Kennzeichen eines aktiven Genstatus (Creyghton *et al.*, 2010; Tie *et al.*, 2009). Weiterführend wäre eine Analyse der Bindung von Ko-Faktoren von TAL1 aus dem pentamerischen Komplex in dieser Region in Zellen verschiedener Entwicklungslinien aufschlussreich. Dadurch könnte nicht nur gezeigt werden, dass TAL1 einen funktionalen Komplex an den *FUBP1*-Promotor in erythroiden Zellen rekrutiert, sondern durch die Zusammensetzung auch abgeleitet werden, ob eine aktivierende Wirkung ausgeübt wird (Lecuyer *et al.*, 2004).

Durch die Analyse mehrerer unabhängig voneinander durchgeführten ChIP-seq-Experimenten und unabhängig erstellten Transkriptionsprofile zeigte sich, dass die Regulation von TAL1 meist mit der Regulation von GATA1 verbunden ist und sich deren jeweilige Bindemotive oft in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (Love *et al.*, 2014). Auf dem Promotor von *FUBP1* finden sich jedoch keine GATA-Motive in der Nähe der vorhandenen E-Boxen. Es existieren auch keine veröffentlichten ChIP-seq-Daten, welche eine Bindung von GATA-Familienmitgliedern zeigen. Daher kann vermutet werden, dass sich GATA1 nicht auf dem Promotor von *FUBP1* in Verbindung mit TAL1 befindet. TAL1 ist in der Lage, im Heterodimer zusammen mit LMO2 und LDB1 einen GATA1-unabhängigen Kernkomplex zu bilden, der vor allem aktivierend auf Zielgene wirkt (Kerenyi *et al.*, 2010). Auch dies könnte eine aktivierende Funktion von TAL1 erklären.

Dass die E-Box, an der die höchste TAL1-Bindung stattfand, effektiv an der Aktivierung von *FUBP1* beteiligt ist, konnte in einem Luciferase-Reportergenversuch gezeigt werden, in welchem diese E-Box mit einer mutierten verglichen wurde, an welcher TAL1 nicht mehr binden kann. In einer erythroleukämischen Zelllinie fiel die Aktivierung außerdem stärker aus, als in einer Zelllinie renalen Ursprungs (siehe Abbildung 3.6B). Die stärkere Aktivierung in den erythroleukämischen Zellen könnte mit der in diesen Zellen vorhandenen Expression von TAL1 und dessen Interaktionspartnern des pentamerischen Komplexes zusammenhängen. Die Expression von LMO2 ist, analog zu der von TAL1, essentiell für die Erythropoese und mit dieser assoziiert, während die LMO2-Expression in T-Zellen ebenfalls mit T-ALL assoziiert ist (Sanchez-Garcia *et al.*, 1993; Valge-Archer *et al.*, 1994; Warren *et al.*, 1994). LMO2 vermittelt die Bindung zwischen dem TAL1-Heterodimer und dessen Interaktionspartner LDB1, so dass ein Kernkomplex entsteht, der weitere Aktivatoren oder Repressoren binden kann (siehe Abbildung 2.8; Meier *et al.*, 2006; Osada *et al.*, 1995; 1997; Tripic *et al.*, 2009; Wadman *et al.*, 1997). In der Nierenzelllinie werden aber weder TAL1 noch das Adapterprotein LMO2 exprimiert (Uhlen *et al.*, 2015). Wenn *FUBP1* tatsächlich im erythroiden Kontext durch TAL1 aktiviert wird, führt die Abwesenheit von TAL1 und LMO2 zu einer geringeren Aktivierung von *FUBP1*, so wie es hier in der Nierenzelllinie beobachtet wurde.

Neben der erhöhten Promotor-Aktivität von *FUBP1* in Anwesenheit von TAL1 wurde außerdem gezeigt, dass TAL1 auch die tatsächliche Expression von *FUBP1* induziert. Dieser Versuch wurde in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt, wobei in allen eine erhöhte *FUBP1*-Expression gemessen wurde (siehe Abbildung 3.7D-F). Daraus lässt sich ableiten, dass die Regulierung von *FUBP1* durch TAL1 robust zu sein scheint. Denn die ektope Expression von TAL1 reicht in der Zelllinie renalen Ursprungs aus, um die *FUBP1*-Expression zu induzieren, obwohl hier die Interaktionspartner des pentamerischen Komplexes suboptimal exprimiert werden. In der erythroleukämischen Zelllinie fiel die

induzierte Expression am niedrigsten aus. Dies könnte daran liegen, dass TAL1 in dieser Zelllinie ohnehin bereits stark exprimiert wird (Uhlen *et al.*, 2015) und ein weiterer Anstieg der TAL1-Expression die Expression von Zielgenen nicht mehr weiter beeinflussen kann, da diese schon auf hohem Niveau exprimiert werden. Etwaige Artefakte, welche durch den Einsatz von Überexpressionsvektoren verursacht werden können, sollten ausgeschlossen werden, indem in den endogenen TAL1-exprimierenden Zellsystemen (K562-Zellen, CD34<sup>+</sup>-Zellen) ein *TAL1-knock down* durchgeführt wurde. In den primären HSPCs war nach dem *knock down* von *TAL1* auch die Expression von *FUBP1* klar reprimiert (siehe Abbildung 3.8E). Dies belegt deutlich die Abhängigkeit der *FUBP1*-Expression von TAL1. Dass in der erythroleukämischen Zelllinie keine Abhängigkeit der *FUBP1*-Expression von TAL1 gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3.8C), könnte an der anormalen Genexpression liegen, welche mit der Transformation zu Krebszellen einhergeht. So werden möglicherweise weitere Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche die Expression von *FUBP1* aktivieren. Interessanterweise weist der Promotorbereich von *FUBP1* in K562-Zellen zwei Bindestellen für MYC auf (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). *MYC* ist das prominenteste Zielgen von *FUBP1* und wird in K562-Zellen konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert (del Senno *et al.*, 1986; Gambari *et al.*, 1984; He *et al.*, 2000a; Tonini *et al.*, 1987). Hier besteht die Möglichkeit einer gegenseitigen regulatorischen *feed forward*-Schleife von *FUBP1* und *MYC*.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TAL1 den Promotor von *FUBP1* besetzt und dies mit erythroider Differenzierung korreliert. Außerdem ist die *FUBP1*-Expression abhängig von TAL1 und wird von TAL1 aktiviert. Diese Aktivierung wiederum ist abhängig von einer intakten TAL1-Bindestelle. Nimmt man die Ergebnisse zusammen, wurde *FUBP1* als neues Zielgen von TAL1 identifiziert. Die Ergebnisse weisen für *FUBP1* als TAL1-Zielgen außerdem auf eine Funktion in der erythroiden Differenzierung hin.

## 4.2 FUBP1 ist an der erythroiden Differenzierung beteiligt

### 4.2.1 FUBP1 wird während der erythroiden Differenzierung verstärkt exprimiert

*FUBP1* ist ein wichtiger transkriptioneller Regulator, der neben seiner Rolle in der Karzinogenese auch an der Bildung verschiedener Organe, wie Lunge und Nervensystem beteiligt ist (Kim *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2013). Auch mit der Hämatopoese wurde *FUBP1* in Zusammenhang mit der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und der Bildung verschiedener hämatopoetischer Entwicklungslinien (Rabenhorst *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016) assoziiert. Auf Basis von mRNA-Expressionsprofilen und dem Vorhandensein von *cis*-Elementen bekannter Transkriptionsfaktoren wurde für *FUBP1* eine Rolle in der Hämatopoese in der



Regulierung von Erythropoese und Granulopoese vorausgesagt (Novershtern *et al.*, 2011).

Die Expression von *FUBP1* ist in den erythroleukämischen K562-Zellen und in HSCs hoch. Dabei deckte sich die in dieser Arbeit ermittelte RNA-Expression mit den bei BioGPS hinterlegten Daten (siehe Abbildung 3.1A). Wurden die HSCs in die erythroide Richtung differenziert, stieg die *FUBP1*-Expression stark an (siehe Abbildung 3.2D). Dies verdeutlicht, dass *FUBP1* neben seiner bekannten Rolle in HSCs wahrscheinlich auch eine Funktion in der Erythropoese inne hat, die durch *TAL1* gesteuert wird.

#### **4.2.2 Keine Hinweise für Einfluss von *TAL1* auf *FUBP1* während megakaryozytärer Differenzierung**

Da aus megakaryozytär-erythroide Vorläuferzellen (MEPs) sowohl erythroide als auch megakaryozytäre Zellen hervorgehen, liegen diese beiden Entwicklungslinien eng beieinander. In beiden Linien ist *TAL1* von Bedeutung (Lecuyer *et al.*, 2004; McCormack *et al.*, 2006), was auch in der erhöhten Expression von *TAL1* in Differenzierungsversuchen in dieser Arbeit zu sehen war (siehe Abbildung 3.2E; Abbildung 3.3E). Außerdem befindet sich die RNA-Polymerase II in megakaryozytär differenzierten HPSCs angereichert auf dem *FUBP1*-Promotor (siehe Abbildung 3.5B). Zusammengenommen ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass *FUBP1* auch in der megakaryozytären Entwicklungslinie von *TAL1* reguliert wird.

Die *FUBP1*-Expression während megakaryozytärer Differenzierung ist allerdings nicht verändert und umgekehrt wurde kein Einfluss eines *FUBP1-knock down* auf die megakaryozytäre Markerexpression detektiert (siehe Abbildung 3.3D; Abbildung 3.10E). Die erhöhte *TAL1*-Expression in den megakaryozytär differenzierten Zellen geht auch nicht mit einer Anreicherung von *TAL1* auf dem Promotor von *FUBP1* einher (siehe Abbildung 3.5C). Da zwar die RNA-Polymerase, aber nicht *TAL1* auf dem Promotor vorhanden ist, und die Expression von *FUBP1* während der megakaryozytischen Differenzierung nicht ansteigt, könnte hier die Erklärung die Bindung eines reprimierenden Proteinkomplex sein. Insgesamt lassen sich keine Hinweise finden, die auf eine Funktion von *FUBP1* während der megakaryozytären Differenzierung hindeuten. Auch kann hier kein Zusammenhang zur Regulation durch *TAL1* hergestellt werden.

#### **4.2.3 Die Rolle von *FUBP1* in der Erythropoese**

Die Erythropoese wird hauptsächlich durch wenige erythroide Masterregulatoren gesteuert. Dazu gehören *TAL1*, *GATA1*, *KLF1*, *LDB1* und *LMO2* (Cantor *et al.*, 2002). Dabei können *TAL1*, *GATA1* und *KLF1* auch außerhalb des pentamerischen Komplexes Interaktionspartner binden und spezifisch Zielgene regulieren (Kerenyi *et al.*, 2010). Die bioinformatische Auswertung von *TAL1*-ChIP-seq-Experimenten hat sich bei der

Identifizierung und Validierung von Zielgenen bisher vor allem auf solche Gene konzentriert, die eine schon bekannte Rolle in der Erythropoese haben (Kassouf *et al.*, 2010). *FUBP1* ist in der Literatur vor allem mit Apoptose-Inhibierung, Zellmigration und Proliferation assoziiert (de Nigris *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2009; Levens, 2002; Morrish *et al.*, 2009; Rabenhorst *et al.*, 2009). Diese Prozesse sind zwar auch für die erythroide Differenzierung relevant, jedoch nicht spezifisch. Vermutlich wurde die durch ChIP-seq-Experimente ermittelte Bindung von TAL1 auf dem *FUBP1*-Promotor in K562-Zellen (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a) daher noch nicht validiert und auf eine Rolle in der Erythropoese hin untersucht. Da *FUBP1* in dieser Arbeit als Zielgen von TAL1 bestätigt wurde und TAL1 ein Masterregulator der Erythropoese ist, liegt die Vermutung nahe, dass FUBP1 die vorausgesagte Funktion in der erythroiden Differenzierung übernimmt.

Es existieren bereits erste Anhaltspunkte für eine Funktion von *FUBP1* in der Erythropoese, die bislang aber noch auf die embryonale Erythropoese beschränkt sind und nicht miteinander und mit der Regulation durch TAL1 in verknüpft wurden. Ein erster experimenteller Beleg auf die Rolle von FUBP1 in der Erythropoese findet sich bei Rabenhorst *et al.* (2015), wobei signifikant weniger Glycophorin A-positive Zellen in der fetalen Leber (E15.5) von *Fubp1<sup>null/null</sup>-Genetrap*-Mäusen gemessen wurden. Einen weiteren Hinweis liefert die Arbeit von Zhou *et al.* (2016), in welcher in der Leber von *Fubp1<sup>-/-</sup>-knockout*-Embryos (E13.5 und E19.5) eine „*trilineage anemia*“ festgestellt wurde, wobei diese Anämie auch die erythroide Entwicklungslinie betraf. Zusätzlich ist die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen (mESCs) in die erythroide Richtung eingeschränkt, wenn *Fubp1* ausgeschaltet ist (Dr. Josephine Wesely, Prof. Dr. Martin Zörnig, unveröffentlicht).

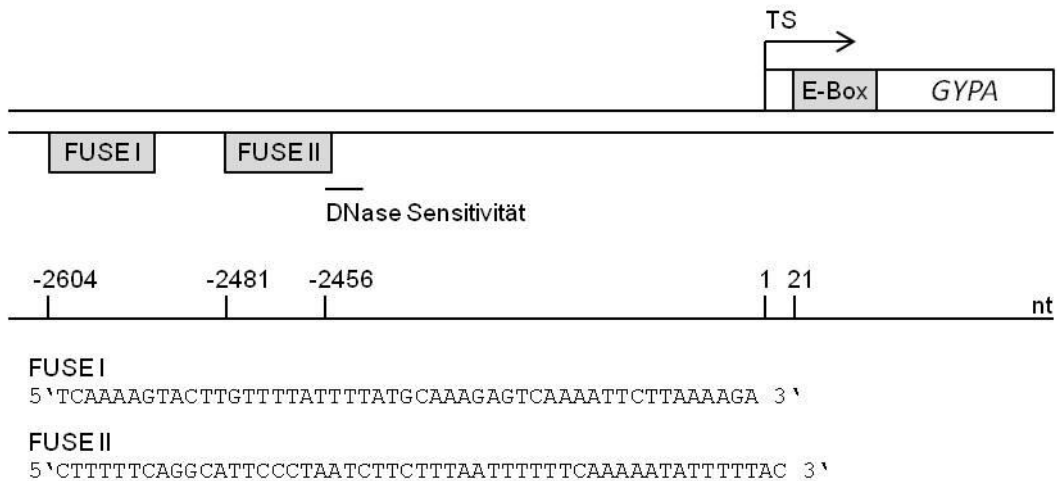
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Funktion von FUBP1 in der erythroiden Differenzierung. Es wurde gezeigt, dass die Herabregulierung von *FUBP1* in humanen HSPCs dazu führt, dass diese nur noch halb so viele erythroide Kolonien bilden, wenn sie in Methylzellulose unter Bedingungen kultiviert werden, welche die Differenzierung in verschiedene Richtungen zulässt (siehe Abbildung 3.11C). Bei der Differenzierung in andere Entwicklungslinien konnte kein Unterschied festgestellt werden, wobei allerdings die Entwicklung von Monoblasten und Myeloblasten durch FUBP1 reprimiert sein könnte (siehe Abbildung 3.11B). Dies lässt sich aus den durchgeführten Experimenten nicht klar ableiten, wohingegen die spezifische Funktion von FUBP1 in der erythroiden Differenzierung deutlich belegt wurde. Somit fördert FUBP1 die erythroide Differenzierung, während es möglicherweise die Differenzierung in andere Entwicklungslinien unterdrückt. Es zeigte sich weiterhin, dass die GYPA-Expression FUBP1-defizienter Zellen reprimiert ist, wenn Bedingungen für die erythroide

Differenzierung vorliegen (siehe Abbildung 3.10E). Sehr aufschlussreich wäre die Generierung eines Hämatopoese-spezifischen (konditionalen) *FUBP1-knock out*-Mausmodells. Hier könnte man über den zeitlichen Verlauf die Wirkung eines FUBP1-Verlustes auf die verschiedenen hämatopoetische Zelltypen z.B. per Fluoreszenz-unterstützte Zellsortierung (FACS) analysieren. Außerdem ist *in vivo* auch eine Untersuchung der terminalen erythroiden Differenzierung im Gegensatz zur Verwendung von Zellkultursystemen möglich. Letale Effekte durch den Verlust der essentiellen *FUBP1*-Expression in allen Zelltypen würde durch die Begrenzung des *knock out* auf die hämatopoetischen Entwicklungslinien vermieden werden.

GYPA, das in Abwesenheit von FUBP1 reprimiert ist, stellt einen wichtigen Bestandteil der Erythrozytenmembran dar und ist ein prominenter Marker für erythroide Differenzierung (Andersson *et al.*, 1981; Loken *et al.*, 1987; Marchesi, 1977). Es vermittelt die Translokation des Anionen-Austauscher 1 (SLC4A1) an die Plasmamembran und trägt zu dessen Aktivität bei (Bruce *et al.*, 2004; Groves *et al.*, 1992; Pang *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2000; 2003). Fehlt Erythrozyten GYPA, weisen sie schlechtere Werte für den Transport verschiedener Ionen auf (Bruce *et al.*, 2004; Groves *et al.*, 1992). Mit der Abwesenheit von GYPA sind keine Krankheitssymptome assoziiert. Da GYPA allerdings als Rezeptor für verschiedene Viren, *Plasmodium falciparum* und *Babesia rodhaini* dient, kann dessen Abwesenheit die Resistenz gegen diese Infektionen erhöhen (Baron *et al.*, 1983; Burness *et al.*, 1983; Sanchez *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 1994; Takabatake *et al.*, 2007). Diese Eigenschaften könnten durch FUBP1 beeinflusst werden, wobei es sehr aufschlussreich wäre zu klären, ob der Effekt von FUBP1 auf die GYPA-Expression direkt oder indirekt erfolgt.

Zur Klärung, ob sich FUBP1 auf GYPA befindet, muss der Promotorbereich von GYPA auf eine potentielle Bindung von FUBP1 hin analysiert werden. In etwa 2,5 kb Entfernung stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden sich zwei Sequenzen, welche Merkmale einer FUBP1-Bindestelle aufweisen (siehe Abbildung 4.1): mehrere poly-T-Bereiche befinden sich auf einer Länge von 51 bzw. 48 Nukleotiden, konzentriert auf dem Negativstrang, weit stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt. Diese Sequenzen überlappen sich teilweise mit einem Bereich mit DNase-Hypersensitivität, welcher nicht kondensierte Chromatin-Bereiche charakterisiert (ENCODE, 2012; Wang *et al.*, 2012b). Daher könnte hier eine direkte Regulation von GYPA durch FUBP1 erfolgen. Diese Möglichkeit könnte man mit DNA-Bindungsexperimenten von FUBP1 untersuchen, wobei geeignete Methoden *Electromobility shift assays* (EMSA) oder die Analyse am *AlphaScreen*® wären. Zusätzlich könnte ein ChIP-Experiment durchgeführt werden, um die Bindung in Zellen von FUBP1 auf dem GYPA-Promotor zu bestimmen. Sollte sich bestätigen, dass GYPA ein Zielgen von FUBP1 ist, könnte man daraus ableiten, dass

FUBP1 seine Wirkung in der Erythropoese durch die Bindung und Aktivierung weiterer erythroider Gene erreicht. Interessant wäre in diesem Zusammenhang sicher die Analyse von erythroiden Transkriptionsfaktoren der höheren Hierarchieebenen, wobei im Rahmen dieser Arbeit keine Effekte durch FUBP1 auf z.B. KLF1 sichtbar wurden und man diesen Transkriptionsfaktor daher vermutlich jetzt schon als Zielgen ausschließen kann (siehe Abbildung 9.1).



**Abbildung 4.1: Mögliche FUBP1-Bindestellen auf dem GYPA-Promotor.** Dargestellt ist der Promotorbereich von GYPA mit Transkriptionsstart (TS; Pfeil). Auf dem Negativstrang befinden sich zwei Sequenzen, welche Merkmale von FUSE-Sequenzen (FUSE I, FUSE II) als potentielle Bindungsstellen für FUBP1 aufweisen. In der 5'-UTR von GYPA befindet sich eine TAL1-Bindesequenz (E-Box), die in Chromatin-Immunopräzipitationsexperimenten mit anschließender Sequenzierung bestätigt wurde (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a).

Verantwortlich für indirekte Effekte nach Aktivierung von *FUBP1* durch TAL1 ist wahrscheinlich die Regulation der Ziele von FUBP1. Darunter befinden sich *P15*, *P21*, *P27*, *BIK*, *NOXA*, *TRAIL* und *MYC*.

Wichtige Zielgene von FUBP1 im Zusammenhang mit der erythroiden Differenzierung sind die Zellzyklusinhibitoren *P15* (*CDKN2B*), *P21* (*CDKN1A*) und *P27* (*CDKN1B*), da von einem intakten Zellzyklus die kontrollierte Differenzierung abhängt (Sherr *et al.*, 1995). *P15* ist gemeinsam mit dem Tumorsuppressorgen *P16 / P19* (*CDKN2A*) in einer Region lokalisiert, die in etwa 10 % der T-ALL-Fälle deletiert ist (Chilcote *et al.*, 1985; Kowalczyk *et al.*, 1983). Durch *P15* wird die Zellzyklusprogression in die G1-Phase kontrolliert (Hunter *et al.*, 1994; Sherr *et al.*, 1995). Die epigenetische Inaktivierung von *P15* ist häufig in hämatopoetischen Störungen wie z.B. akuter myeloider Leukämie (AML) zu beobachten (Humeniuk *et al.*, 2013). Wird *FUBP1* nun durch TAL1 aktiviert, könnte in Folge die *P15*-Expression durch FUBP1 inhibiert und somit ein möglicher Zellzyklusarrest

aufgehoben werden. Dies könnte einen möglichen Kontrollpunkt im intakten Zellzyklus darstellen, der passiert wird, wenn sich in der Zelle genug TAL1 angesammelt hat, um eine weitere korrekte erythroide Differenzierung zu gewährleisten. Bei einer malignen Überexpression von TAL1 würde demgemäß über FUBP1 die Zellzykluskontrolle durch P15 ausgeschaltet werden, so dass es zur vermehrten Zellproliferation käme.

Eine ähnliche Rolle bei der Zellzyklusregulation wie P15 hat P21, das über den prominenten Tumorsuppressor P53 gesteuert wird (el-Deiry *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu P15 wird P21 aber auch direkt über TAL1 reguliert (Chagraoui *et al.*, 2011; Lacombe *et al.*, 2010). Da die Regulation sowohl über TAL1 als auch über FUBP1 erfolgen kann, ist es schwierig, die daraus resultierenden Effekte eindeutig einem der beiden Transkriptionsfaktoren zuzuordnen. Hinzu kommt, dass TAL1 je nach Zelltyp sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Expression von P21 wirken kann. Während die Wirkung in megakaryozytären Zellen inhibierend ist, wird P21 in LT-HSCs aktiviert, um deren Langzeit-Repopulierungs-Kapazität zu erhalten (Chagraoui *et al.*, 2011; Lacombe *et al.*, 2010). Außerdem ist auch ein indirekter Effekt von TAL1 auf P21 bekannt: indem TAL1 Heterodimere mit E47 bildet, steht dieses nicht mehr zur Aktivierung von P21 zur Verfügung, da die Bindungsaffinität von E47-Homodimeren für P21 geringer ist (Park *et al.*, 1998). Hier wäre die Analyse des Promotors von P21 sinnvoll, wobei die Bindung von TAL1 und FUBP1 sowie möglichen Interaktionspartnern während der erythroiden Differenzierung und / oder nach einem *FUBP1-knock down* untersucht wird. Ein weiterer Aspekt von P21, mit Relevanz im Kontext der Therapie von ALLs, ist die von P21 vermittelte Apoptose, die durch das Medikament Vorinostat induziert wird. P21 moduliert die Sensitivität von ALL-Zellen dem Medikament gegenüber (Davies *et al.*, 2015). Wenn nun P21 durch TAL1 / FUBP1 inhibiert wird, kann es im Rahmen einer Therapie keine Apoptose in transformierten Zellen induzieren und deren Sensitivität gegenüber dem Therapeutika nicht steigern, so dass die Therapie weniger effizient wirkt. Dieses schlechtere Ansprechen auf eine Therapie könnte der Grund für die schlechteren Prognosen sein, die mit TAL1- bzw. FUBP1-assoziierten Krankheiten bekannt sind (Ferrando *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2015).

Ein dritter Zellzyklusinhibitor, P27, kann die erythroide Differenzierung induzieren und in der terminalen erythroiden Differenzierung die Enukleation der Erythroblasten steuern (Acosta *et al.*, 2008; Gnanapragasam *et al.*, 2016). P27 wird durch FUBP1, in dessen Eigenschaft als RNA-bindendes Protein, positiv reguliert. In der Brustkrebszelllinie MCF7 wurde die Bindung von FUBP1 an die IRES in der 5'-UTR gezeigt, was die Translation von P27 verstärkt (Zheng *et al.*, 2011). Allerdings wird P27 durch das ebenfalls von FUBP1 aktivierte MYC inhibiert und die Anwesenheit von P27 führt zu einer MYC-vermittelten Inhibition der erythroiden Regulatoren GATA1 und LMO2 in der

erythroleukämischen Zelllinie K562 (Acosta *et al.*, 2008). Da die MYC-Expression im Erythroblasten-Stadium ihren Höhepunkt hat, könnte die Inhibition von *P27* durch MYC eine vorzeitige Reifung und Eukleation der erythroiden Zellen verhindern. Somit vermittelt FUBP1 auch hier als Mediator die durch TAL1 bedingte erythroide Differenzierung.

Über die Tumorsuppressor-Gene *BIK*, *NOXA*, *TNF* und *TRAIL* ist die Einflussnahme von FUBP1 auf die erythroide Differenzierung ebenfalls möglich. Alle diese Gene werden durch FUBP1 inhibiert und wirken pro-apoptotisch (Han *et al.*, 1996; Rabenhorst *et al.*, 2009; Robaye *et al.*, 1991; Shibue *et al.*, 2003; Suliman *et al.*, 2001). Im Kontext der Proliferation sich differenzierender Zellen scheint eine Einschränkung der Apoptose sinnvoll. Auch hier könnte dies die Erklärung sein, weshalb bei einer malignen Überexpression von TAL1 und der daraus folgenden übermäßigen Aktivierung durch FUBP1 die für Krebs charakteristische Resistenz gegenüber Apoptose entsteht. *NOXA* weist außerdem eine TAL1-Bindestelle im Promotorbereich auf, weshalb für *NOXA* auch die Möglichkeit der direkten Regulierung durch TAL1 besteht. Interessanterweise besitzen alle aufgeführten Zielgene von FUBP1 auch Bindestellen für MYC, das vor allem mit der Aktivierung von Genen in Zusammenhang steht (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a).

Da MYC ca. 15 % der gesamten zellulären Gene positiv reguliert und eine bekannte Rolle in der erythroiden Differenzierung inne hat, könnte es im hämatopoetischen Kontext als erythroider Amplifikator dienen (Anantharaman *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2006; Frojmark *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2009; Ott, 2014): durch TAL1 wird FUBP1 aktiviert, welches wiederum die MYC-Expression positiv beeinflusst. Durch MYC wird eine Verstärkung der Genexpression in der sich erythroid differenzierenden Zelle erreicht. Dabei sind aufgrund ihrer MYC-Bindestelle auch die FUBP1-Zielgene *P15*, *P21*, *BIK*, *NOXA* und *TRAIL* zu den eventuell durch MYC aktivierten Kandidaten zuzuordnen, während *P27* aktiviert wird. Anhand dieses potentiellen regulativen Netzwerks wird deutlich, wie TAL1 seine Wirkung ausübt und durch Mediatoren wie FUBP1 und MYC verstärken kann. Bemerkenswert ist, dass der Promotor von *MYC* auch über potentielle TAL1-Bindestellen verfügt.

### **4.3 MYC wird von TAL1 und FUBP1 im erythroiden Hintergrund reguliert**

#### **4.3.1 MYC ist ein Zielgen von TAL1 in humanen hämatopoetischen Zellen**

Obwohl MYC im Allgemeinen mit einem Differenzierungsblock in Zusammenhang steht, wird es in erythroiden Vorläuferzellen neben deren Expansion auch für deren Differenzierung benötigt. Seinen Expressionshöhepunkt hat *MYC* in der Erythroblastenbildung (Anantharaman *et al.*, 2011; Frojmark *et al.*, 2010; Guo *et al.*,

2009). Durch MYC wird die vorzeitige Reifung von erythroiden Vorläuferzellen verhindert, indem die *P27*-Expression und die *P27*-vermittelten Effekte der erythroiden Differenzierung inhibiert werden (Acosta *et al.*, 2008). Da in der vorliegenden Arbeit als Modell der erythroiden Differenzierung die Kultivierung humaner HSPCs mit EPO verwendet wurde, können Zusammenhänge während der späten Phase der erythroiden Differenzierung nicht untersucht werden. In der Zellkultur ohne *Feeder*-Zellen und weitere Stimuli kann die erythroide Differenzierung nicht über das Erythroblastenstadium hinausgehen, da die Interaktion mit Makrophagen als notwendig für Eukleation vermutet wird, welche die terminale erythroide Differenzierung charakterisiert (Lee *et al.*, 2015; McGrath *et al.*, 2008; Miharada *et al.*, 2006; Scicchitano *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wären Versuche im Hintergrund eines *Fubp1*-negativen Mausmodells aufschlussreich, da *in vivo* die Bedingungen für die vollständige Erythropoese gegeben sind.

Von TAL1 ist bekannt, dass es die Expression von Proteinen mit bHLH-Domäne reguliert, zu denen auch das bHLHZIP-Protein MYC gehört. Außerdem wurde *MYC* bereits als direktes funktionales Zielgen von TAL1 von Kassouf *et al.*, in einer Genom-weiten Studie in murinen fetalen Leberzellen identifiziert (2010). Die bioinformatische Analyse des *MYC*-Promotors ergab, dass sich mehrere E-Boxen darauf befinden. Beim Abgleich mit veröffentlichten ChIP-seq-Daten aus K562-Zellen wurde auch eine Sequenz mit einer Anreicherung von TAL1 ermittelt, die jedoch keine E-Box beinhaltet (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Hier ist eine DNA-Bindung von TAL1 möglich, die über einen Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors vermittelt wird (Porcher *et al.*, 1999). Durch die Analyse des *MYC*-Promotors mittels ChIP-Experimenten wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Bindung von TAL1 gezeigt (siehe Abbildung 3.18C). Allerdings fand sich in K562-Zellen die größte Anreicherung in einem Bereich, der nicht deckungsgleich mit der veröffentlichten Bindungssequenz war. In HSPCs wurde die publizierte Bindungssequenz jedoch deutlich bestätigt (siehe Abbildung 3.21B). Über ein weiteres ChIP-Experiment könnten die anderen Bindungspartner von TAL1 auf der entsprechenden Sequenz identifiziert werden. Anschließend könnten die ermittelten Proteine sowie TAL1 zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen z.B. in EMSA- oder *AlphaScreen*®-Analysen mit der DNA-Sequenz, in welcher die TAL1-Bindung gemessen wurde, eingesetzt werden. Da vor allem das regulative Zusammenspiel im erythroiden Kontext von Interesse ist, würde die Analyse des *MYC*-Promotors in erythroid differenzierten HSPCs mit einem ChIP-Experiment und Bestimmung der Genexpression klären, ob *MYC* während der erythroiden Differenzierung vermehrt durch TAL1 gebunden und reguliert wird und ob sich die Zusammensetzung des Proteinkomplexes abhängig von der Differenzierung verändert. Interessant ist auch, dass *TAL1* eine durch ChIP-seq

ermittelte (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a) Bindestelle für MYC hat. Ob und unter welchen Umständen MYC *TAL1* bindet und welchen Effekt dies hat, wäre im Zusammenhang der erythroiden Differenzierung wichtig zu klären. Eventuell liegt hier ein regulatorischer *feed forward*-Kreislauf vor, der für das Ansteigen von MYC bis zum Stadium der Erythroblasten sorgt.

Dass *TAL1* die Expression von *MYC* induziert und diese auch von *TAL1* abhängig ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit in humanen Primärzellen und in einer erythroleukämischen Zelllinie gezeigt werden (siehe Abbildung 3.14B-C; Abbildung 3.15B). Offen bleibt allerdings, ob dies direkt über *TAL1* geschieht, oder über *FUBP1* vermittelt wird. Da *TAL1* auf dem Promotor detektiert wurde, macht dies eine direkte Steuerung wahrscheinlich. Die direkte Beteiligung von *TAL1* könnte die spezifischen Effekte bedingen, die für *MYC* in der erythroiden Differenzierung gezeigt wurden. Dabei könnte *TAL1* durch Rekrutierung weiterer Ko-Faktoren die Spezifität von *MYC* für seine Zielgene beeinflussen. In murinen embryonalen Stammzellen (ESCs) wurde außerdem die Bindung des durch *TAL1* aktivierten *KLF1* an den *MYC*-Promotor und dessen darauf folgende Trans-Aktivierung gezeigt (Pang *et al.*, 2012). Diese weitere Möglichkeit der positiven Beeinflussung durch *TAL1*, sowie die Anreicherung der RNA-Polymerase II auf dem Promotor deuten auf eine Aktivierung von *MYC* durch *TAL1* hin.

Denkbar ist auch eine Ko-Regulation von *MYC* durch *TAL1* und *FUBP1*. Obwohl deren Bindestellen 1,5 kb auseinanderliegen, besteht die Möglichkeit, dass über eine Schleifenbildung der DNA *FUBP1* in räumliche Nähe des Transkriptionsstarts und damit gleichzeitig der *TAL1*-Bindestelle bzw. an die DNA gebundenes *TAL1* gebracht wird (Liu *et al.*, 2000; 2006; Yun *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Um das gemeinsame Vorhandensein beider Transkriptionsfaktoren auf dem *MYC*-Promotor zu untersuchen wurde ein sequentielles ChIP-Experiment (ChIP-ReChIP) in K562-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 3.19A-C). Hier konnte jedoch keine gemeinsame Anreicherung festgestellt werden. Da die Ergebnisse von in dieser Zelllinie durchgeführten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit, vermutlich aufgrund der Transformation und des abweichenden Differenzierungsstatus der K562-Zellen, nicht immer mit denen in HSPCs durchgeführten übereinstimmen, wäre eine Wiederholung des Versuchs in CD34<sup>+</sup>-Zellen aufschlussreich. Zusätzliche Information könnte dieser Versuch liefern, wenn undifferenzierte mit erythroid differenzierten HSPCs verglichen würden. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Schleifenbildung wäre das Vorhandensein des basalen Transkriptionsfaktors *GTF2H* im Bereich des Transkriptionsstarts. In HSPCs war für *FUBP1* eine Anreicherung auch in dem Bereich gemessen worden, der durch *TAL1* besetzt wurde, wobei allerdings umgekehrt keine Anreicherung von *TAL1* in der entsprechenden Region der FUSE-Sequenz gemessen wurde (siehe Abbildung 3.21A-B).



Um die Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren unter Berücksichtigung der Chromatinstruktur zu analysieren, könnte außerdem die *chromosome conformation capture*-Technik (3C) verwendet werden. Mit einem 3C-ChIP-Experiment kann die räumliche Organisation des Chromatins untersucht werden.

Da sowohl MYC als auch TAL1 ein HLH-Motiv aufweisen, könnte es hier auch zu einer Protein-Protein-Interaktion kommen, da dieses Motiv Heterodimerisierung mit anderen HLH-Proteinen vermittelt (Davis *et al.*, 1990; Murre *et al.*, 1989b; Shirakata *et al.*, 1993; Voronova *et al.*, 1990). Auffällig ist, dass *FUBP1*, *TAL1*, *GYP A*, *BIK* und *NOXA* in K562-Zellen alle eine durch ChIP-seq ermittelte TAL1-Bindung aufweisen, die sich mit der ebenfalls durch ChIP-seq ermittelten MYC-Bindestelle deckt (Gerstein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; 2013a). Bei einer Heterodimerisierung der beiden Proteine könnte es zu Veränderungen bei der Bindungsaffinität an die DNA, oder bei der Rekrutierung weiterer Ko-Faktoren in den Komplex kommen. Dies könnte zu einer Funktionsänderung von MYC, etwa über Änderung der präferierten Bindungen an die DNA oder mit Interaktionspartnern, führen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und bisherigen Studien zu MYC in der Erythropoese lässt sich die Hypothese aufstellen, dass MYC während der frühen Phasen erythroider Differenzierung durch TAL1 aktiviert wird. Dadurch werden Zellproliferation und -wachstum im Rahmen der erythroiden Differenzierung erhöht. Außerdem verhindert MYC durch die Inhibition weiterer erythroider Regulatoren die vorzeitige Reifung der erythroiden Zellen. Offen bleibt dabei die Frage, inwieweit MYC dazu direkt durch TAL1 gebunden wird.

#### **4.3.2 MYC wird auch während der Erythropoese durch FUBP1 reguliert**

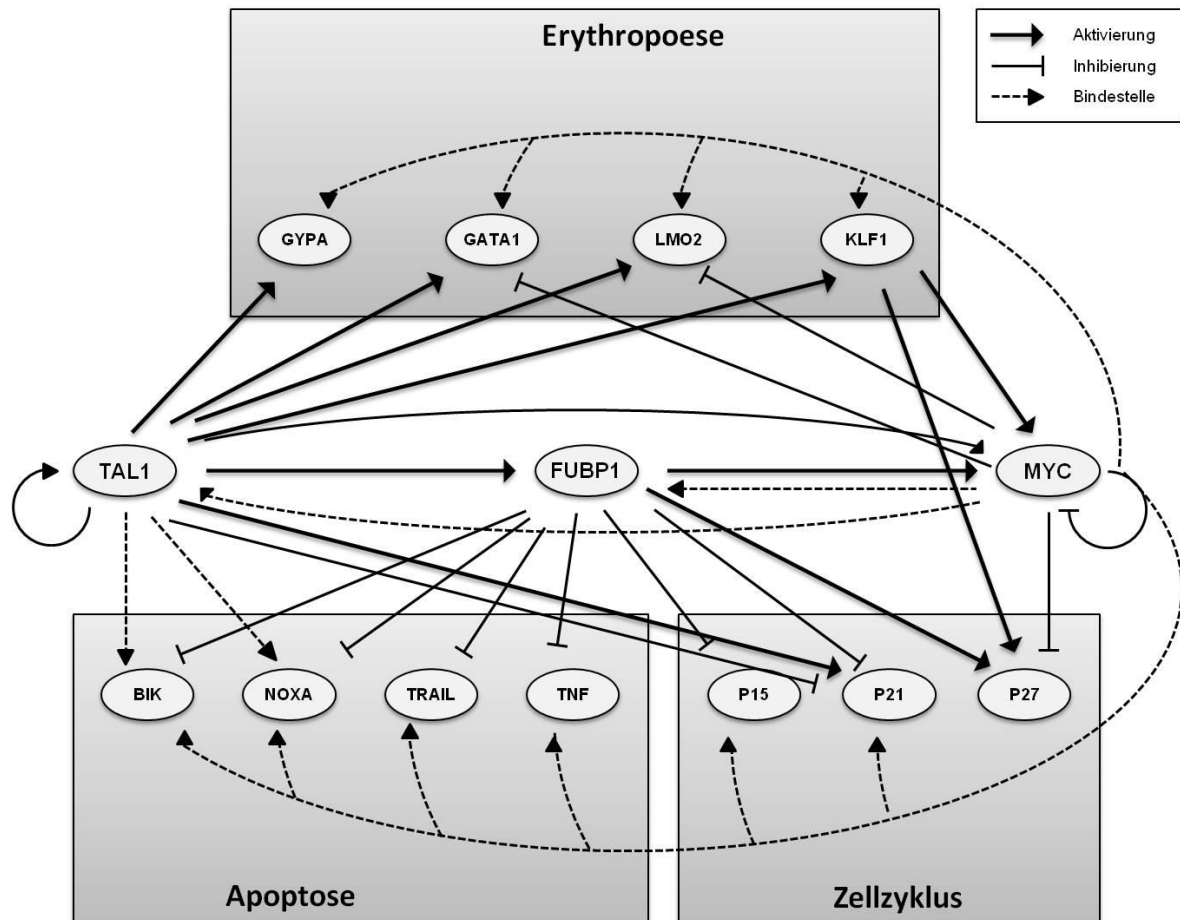
FUBP1 wurde ursprünglich durch die Bindung an die FUSE-Sequenz von MYC und dessen Regulation identifiziert (Avigan *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 1994). Die Aktivierung von MYC durch FUBP1 ist mit Proliferation und Inhibition der Differenzierung verbunden (He *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2003). Bis heute stellt MYC eines der wichtigsten durch FUBP1 regulierten Gene dar. Da die Beteiligung von FUBP1 an der erythroiden Differenzierung gezeigt wurde, stellt sich nun die Frage, ob dies auch die Expression von MYC im erythroidem Kontext beeinflusst. Diese Frage erscheint besonders vor dem Hintergrund der schon bekannten Funktion von MYC in der Erythropoese relevant und gewinnt an Bedeutung, wenn die durch FUBP1 ausgelöste MYC-Überexpression mit malignen Störungen in Verbindung gebracht wird. So wurde kürzlich eine Mutation von FUBP1 mit daraus resultierender gesteigerter MYC-Expression mit der Transformation einer chronischen lymphozytischen Leukämie (CLL) in eine aggressive Form des B-Zell-Lymphoms in Zusammenhang gebracht (Klener *et al.*, 2016), was sich auch auf die erythroide Differenzierungslinie übertragen lassen könnte.

Ebenso wie die Expression von *FUBP1*, stieg die Expression von *MYC* während der erythroiden Differenzierung von HSPCs an (siehe Abbildung 3.16). Während der erythroiden Differenzierung wurde auch vermehrt FUBP1 auf dem *MYC*-Promotor angereichert und dessen Aktivität in erythroleukämischen Zellen war von FUBP1 abhängig (siehe Abbildung 3.22A; Abbildung 3.20C). So wäre der nach dem *FUBP1-knock down* beobachtete negative Effekt auf die erythroide Kolonienbildung über eine nicht ausreichende *MYC*-Expression zu erklären. Die zu erwartende Regulation von *MYC* durch FUBP1 wurde in dieser Arbeit außerdem zum ersten Mal im Kontext der erythroiden Differenzierung mit TAL1 in Verbindung gebracht. Somit übernimmt FUBP1 in der Erythropoese eine Funktion als Mediator, unter anderem über die Aktivierung eines weiteren Masterregulators, wie ihn *MYC* darstellt. Die für die Erythropoese spezifische Wirkung von *MYC* könnte durch die Beteiligung von TAL1 durch Rekrutierung spezifischer Ko-Faktoren moduliert werden. Vor der Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion von TAL1 mit *MYC*, könnten die deckungsgleichen Bindestellen hier ein Hinweis auf einen sich selbst verstärkenden *feed forward*-Kreislauf sein. Aufgrund der Limitationen des in der vorliegenden Arbeit gewählten Modells der erythroiden Differenzierung kann nur die Regulation in frühen Phasen der Erythropoese untersucht werden. Der Einsatz eines *Fubp1*-negativen Mausmodells könnte auch hier weitere Fragen beantworten.

#### **4.4 Hypothese zur Regulation von *FUBP1* und *MYC* unter Beteiligung von TAL1 während der Erythropoese**

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit belegten die Regulation von *FUBP1* durch TAL1 und eine Rolle von FUBP1 während der erythroiden Differenzierung. Außerdem führten sie in Kombination mit bereits veröffentlichten Daten zu einer Hypothese über die Funktionsweise von FUBP1 und die Interaktionen, an denen neben TAL1 und *MYC* die Produkte weiterer Zielgene von FUBP1 beteiligt sind. Dies fasst Abbildung 4.2 zusammen:

Die Aktivierung von *FUBP1* durch TAL1 führt in Folge zur Aktivierung von *MYC*. Durch FUBP1 wird die Apoptose inhibiert und der Arrest des Zellzyklus aufgehoben. Gleichzeitig wird möglicherweise über P27 die erythroide Differenzierung induziert. Wahrscheinlich werden durch FUBP1 weitere erythroide Gene aktiviert. *MYC* wird vermutlich zusätzlich auch direkt über TAL1 reguliert. Hier hätte die Zusammensetzung des von TAL1 rekrutierten Proteinkomplexes Auswirkungen auf die spezifische Wirkung von *MYC* in der erythroiden Differenzierung. Zusätzlich wird *MYC* vom TAL1-Ziel KLF1 aktiviert. Die Expression von *MYC* erfolgt nur bis zum Stadium der Erythroblastenbildung, was an einer veränderten Besetzung des *MYC*-Promotors mit TAL1 bzw. an einer veränderten Zusammensetzung des TAL1-Komplexes liegen könnte, oder dass ab diesem Zeitpunkt die negative Auto-Regulation von *MYC* ausgelöst wird. Da *MYC* die Expression der



**Abbildung 4.2: Regulatorisches Netzwerk um die zentralen Transkriptionsfaktoren TAL1, FUBP1 und MYC.** FUBP1 wird durch TAL1 aktiviert und reguliert seinerseits weitere Zielgene. Dazu gehört die Inhibition Apoptose- und Zellzyklus-assoziiierter Gene, so dass Proliferation und Zellwachstum gefördert werden. Das erythroide Differenzierung induzierende P27 wird dagegen aktiviert, genauso wie MYC und vermutlich weitere erythroide Gene. MYC wird auch durch TAL1 direkt gebunden. Die meisten Zielgene von TAL1 und FUBP1, inklusive diesen beiden Transkriptionsfaktoren selbst, haben Bindestellen für MYC, ebenso wie auch MYC. Durch die Inhibition von P27 durch MYC wird die Vorzeitige Reifung erythroider Zellen verhindert. Von MYC ist eine negative Autoregulation bekannt, während TAL1 sich selbst aktiviert. Zusammengenommen wird durch FUBP1 die Wirkung von TAL1 auf weitere Erythropoese-relevante Gene vermittelt. MYC amplifiziert dabei durch *feed forward*-Schleifen diese Wirkung so lange, bis es sich durch eine negative Autoregulationsschleife selbst reprimiert. Die Amplifikationsphase findet dabei wahrscheinlich in frühen Phasen der Erythropoese statt, während die terminale Differenzierung ohne erhöhte MYC-Expression verläuft.

erythroiden Masterregulatoren GATA1 und LMO2 inhibiert, wird so in frühen erythroiden Entwicklungsphasen die vorzeitige Reifung der Zellen verhindert. Unklar ist allerdings die Funktion der MYC-Bindestellen, die im Promotorbereich nahezu aller von TAL1 und FUBP1 regulierter Gene zu finden sind. Da diese Bindestellen jedoch häufig deckungsgleich mit denen von TAL1 sind, haben sie vermutlich einen regulativen Einfluss. Die in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen unterliegen der Komplexität genetischer

regulativer Netzwerke und zeigen außerdem die Bedeutung von *feed forward*- und autoregulatorischer Schleifen auf (Fujiwara *et al.*, 2009; Kassouf *et al.*, 2010; Swiers *et al.*, 2006).

#### **4.5 Anwendungsmöglichkeiten und Ausblick**

Da TAL1, FUBP1 und MYC sowie die Kombination aus FUBP1 und MYC mit Leukämie- bzw. Tumorerkrankungen und schlechten Therapieprognosen assoziiert sind, kann die genaue Aufklärung des regulatorischen Netzwerks dazu beitragen, Therapien zu verbessern (Ding *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Dies könnte beispielsweise der Einsatz eines FUBP1-Inhibitors in einer mit TAL1 assoziierten T-ALL sein (Hauck *et al.*, 2016; Huth *et al.*, 2004). Dadurch könnten Zellteilung und –wachstum verlangsamt werden und die Klonogenität von Zellpopulationen vermindert werden, was die Teilungsrate und Therapieresistenz leukämischer Zellen positiv beeinflussen könnte (Liu *et al.*, 2015). Weiterhin könnte man FUBP1 auf seine Eignung als Biomarker in T-ALL testen und möglicherweise eine Korrelation mit einem besonders aggressiven oder raschen Krankheitsverlauf herstellen (Yang *et al.*, 2015). Im Kontext der Bluttransfusion existieren zahlreiche Ansätze zur *in vitro* Herstellung von Erythrozyten, um sich von Blutspenden unabhängig zu machen. Hier könnte die Regulation von *FUBP1* in gentechnischen Produktionsansätzen zu einer Verbesserung der Differenzierungsergebnisse führen (Capellera-Garcia *et al.*, 2016; Geiler *et al.*, 2016; Kim, 2014; Migliaccio *et al.*, 2011).

Die nächsten wichtigen Schritte umfassen zunächst die Aufklärung der direkten Regulation von *MYC* durch TAL1 auch in der terminalen erythroiden Differenzierung. Dann sollte ein FUBP1-Inhibitor in einem T-ALL-Hintergrund untersucht und eingesetzt werden, um dessen Potential zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten in T-ALL-Fällen aufzuklären. Parallel dazu wären Korrelationen von der *FUBP1*-Expression in T-ALL und dem Krankheitsverlauf aufschlussreich, was sich gut in Patientenmaterial ermitteln ließe. Und schließlich könnte analysiert werden, ob *FUBP1* einen positiven Einfluss auf die *in vitro*-Herstellung von Erythrozyten hat.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien

Im Folgenden befindet sich eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (siehe Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller.**

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller	Ort
Ampicillin	AMP	Carl Roth	Karlsruhe
Adenosintriphosphat	ATP	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau		Sigma Aldrich	München
Bovines Serumalbumin	BSA	PAA-Laboratories	Pasching
CD34 <i>Micro beads</i>		Miltenyi	Bergisch Gladbach
CryoStor® CS10		Stemcell Technologies	Köln
Dexamethason		Sigma Aldrich	München
Dithiothreitol	DTT	Carl Roth	Karlsruhe
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	DMEM	Thermo Fisher Scientific	Waltham
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	ECL	GE Healthcare	Little Chalfont
Erythropoetin	EPO	Miltenyi	Bergisch Gladbach
Essigsäure, 100 %		Carl Roth	Karlsruhe
Estradiol		Sigma Aldrich	München
Ethanol, 100 %		Carl Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Carl Roth	Karlsruhe
Ethylenglycoltetraessigsäure	EGTA	Carl Roth	Karlsruhe
<i>FCR blocking reagent</i>		Miltenyi	Bergisch Gladbach
Flt-3 Ligand ( <i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i> )		Miltenyi	Bergisch Gladbach
Formaldehyd		Carl Roth	Karlsruhe
Ficoll-Paque		GE Healthcare	Chalfont St Giles
Fetales Kälberserum	FKS	PAN-Biotech	Aidenbach
L-Glutamin		Thermo Fisher Scientific	Waltham
<i>Lysogeny broth Medium</i>	LB	Carl Roth	Karlsruhe
Glycerin		Carl Roth	Karlsruhe
Glycerol		Carl Roth	Karlsruhe
Glycin		Carl Roth	Karlsruhe
Glycylglycin	GlyGly	AppliChem	Darmstadt
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>	GM-CSF	Miltenyi	Bergisch Gladbach
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Carl Roth	Karlsruhe
Interleukin 3	IL3	Miltenyi	Bergisch Gladbach
Interleukin 6	IL6	Miltenyi	Bergisch Gladbach
Interleukin 9	IL9	Miltenyi	Bergisch Gladbach
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>	IMDM	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Isopropanol		Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth	Karlsruhe

<b>Bezeichnung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Luciferin		Carl Roth	Karlsruhe
LS Säulen		Miltenyi	Bergisch Gladbach
β-Mercaptoethanol		Carl Roth	Karlsruhe
Metafectene®		Biontex	München
Methanol	MeOH	Carl Roth	Karlsruhe
MethoCult™ Classic		Stemcell Technologies	Köln
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth	Karlsruhe
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth	Karlsruhe
Mitomycin C		Roche	Basel
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth	Karlsruhe
Mono-Natriumcitrat	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SDS	Carl Roth	Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat		Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth	Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth	Karlsruhe
Nonidet P-40	NP-40	AppliChem	Darmstadt
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	ONPG	Carl Roth	Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin		Thermo Fisher Scientific	Waltham
Polyethylenimin	PEI	Sigma Aldrich	München
Primocin™		InvivoGen	San Diego
Propidiumiodid	PI	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Protaminsulfat		Sigma Aldrich	München
Protease Inhibitor Mix		AppliChem	Darmstadt
Proteinase K		AppliChem	Darmstadt
RNase A		Thermo Fisher Scientific	Waltham
Roti®-Block		Carl Roth	Karlsruhe
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium	RPMI	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Salzsäure	HCl	Carl Roth	Karlsruhe
Serumfreies Expansionsmedium I		Stemcell Technologies	Köln
Serumfreies Expansionsmedium II		Stemcell Technologies	Köln
Stammzellfaktor	SCL	Miltenyi	Bergisch Gladbach
<i>SYBR Green-Mix</i>		Eurogentec	Köln
12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat	TPA	Sigma Aldrich	München
Thrombopoetin	TPO	Miltenyi	Bergisch Gladbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100		Carl Roth	Karlsruhe
Tween-20		Carl Roth	Karlsruhe

### 5.1.2 Geräte

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt (siehe Tabelle 5.2).

**Tabelle 5.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Hersteller.**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav	HAST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
Durchflusszytometrie-Gerät	FACSCanto™	BD Biosciences	Franklin Lakes
Elektrophoresekammer, DNA	PerfectBlue Gelsystem S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Elektrophoresekammer, Protein	Elektrophoresesystem	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Gefrierschrank -20°C	NoFrost Premium	Liebherr	Bulle
Gefrierschrank -80°C	Hettich Freezer	Andreas Hettich	Tuttlingen
Gel- / WB-Dokumentation	Fusion Fx7	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Heizschüttler	MKR13	HLC Biotech	Bovenden
Immunoblotkammer, <i>Semidry</i>	SemiDry Blotter	G + P Kunststofftechnik	Kassel
Inkubator, Bakterien	Kelvitron	Heraeus Holding	Hanau
Inkubator, Zellkultur	Cellstar	Nunc	Wiesbaden
Kippschüttler	Skyline DRS-12 ELM I LTF	Labortechnik	Wasserburg
Kühlschrank, <i>Coldlab</i>	Unichromat 1500	Uni Equip	Martinsried
Luminometer	Microloumat LB96P	Berthold Technologies	Bad Wildbad
Magnetrührer	Ikamag©RET	Ika	Staufen
Mikroskop	Fluovert	Leitz	Wetzlar
Mikrowelle	CE287DN	Samsung	Seoul
pH-Meter	pH Maxx766	Knick	Berlin
Rollmixer	R137	PSI Medizintechnik	Laudenbach
Rotator	SB3	Stuart	Staffordshire
Schüttelinkubator, Bakterien	TH15	Edmund Bühler	Hechingen
Sonifizierer	Bioruptor	Diagenode	Liège
Spektrometer	SpektraMax 340	MWG Biotech	Ebersberg
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Sterilbank	CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Stromgeber	Power Source 300V	VWR	Radnor
Thermoblock	TDB-120	Kisker Biotech	Steinfurt
Thermocycler, qPCR	LightCycler480	Roche	Mannheim
Thermocycler, PCR	Primus 96	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Vortexmischer	Vortex Genie2™	Bender + Hobein AG	Zürich
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn	Balingen
Wasserbad	1003	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen
Zentrifuge, 15 / 50 ml Rörchen	Megafuge 1.0	Heraeus Holding	Hanau
Zentrifuge, Bakterien	Avanti™ J-25	Beckmann Coulter™	Brea
Zentrifuge, kühlbar	CT15RE	Hitachi High Technologies	Mannheim
Zentrifuge, Virus	L8-60M Ultracentrifuge	Beckmann Coulter™	Brea
Zentrifuge, Zellkultur	Rotanta 460R	Andreas Hettich	Tuttlingen

## 5.2 Zellbiologische Methoden

### 5.2.1 Kultivierungsbedingungen von eukaryotischen Zelllinien

HEK293T-, HEL-, HL60-, Jurkat-, K562-, TF1- und U937-Zellen wurden bei 37°C im Inkubator mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % mit den entsprechenden Medien (siehe Tabelle 5.3) kultiviert.

**Tabelle 5.3: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien.** FKS - Fetales Kälberserum, P / S - Penicillin / Streptomycin.

Bezeichnung	Gewebe	Morphologie	Medium
HEK293T	embryonale Nierenzellen	adhärente Zellen	DMEM; 10 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin
HEL	Erythroblasten eines Patienten mit Erythroleukämie	Suspensionszellen	RPMI; 10 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin
HL60	Promyeloblasten einer Patientin mit AML	Suspensionszellen	IMDM; 20 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin
Jurkat	T-Lymphozyten eines Patienten mit T-Zell-Leukämie	Suspensionszellen	RPMI; 10 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin
K562	Lymphoblasten eines Patienten mit CML	Suspensionszellen	RPMI; 10 % FKS, 1 % P / S, 2 mM Glutamin
TF1	Erythroblasten eines Patienten mit Erythroleukämie	Suspensionszellen	RPMI; 10 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin, 2 ng / ml GM-CSF
U937	Lymphozyten eines Patienten mit histiozytischem Lymphom	Suspensionszellen	RPMI; 10 % FKS, 100 U / ml P / S, 2 mM Glutamin

### 5.2.2 Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen

Vom DRK Blutspendedienst Frankfurt wurde Blut von mit *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) behandelten Stammzellspendern zur Verfügung gestellt.

Das Blut wurde mit PBS / EDTA in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 mit einem Gesamtvolumen von 30 ml verdünnt und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque gegeben. Danach wurden die Ansätze für 40 bis 60 Minuten mit 400 g bei Raumtemperatur ohne Bremsen zentrifugiert. Mit einer 2 ml-Pipette wurde die Schicht aus mononuklearen Zellen aus der Phasengrenze zwischen Ficoll-Paque und Plasmaslösung in ein frisches 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurde es vermieden, Erythrozyten mitzuführen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS / EDTA gewaschen. Dazu wurde das Volumen auf 50 ml aufgefüllt und mit 800 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden alle Ansätze vereinigt und mit kaltem MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 15 µl abgenommen und 1:100 verdünnt für die Zellzahlbestimmung eingesetzt. Der Ansatz wurde anschließend mit 1300 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer auf 3,3 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml eingestellt. Zum Blockieren wurden 100 µl FCR



*blocking reagent* je  $10^8$  Zellen verwendet und für 5 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  unter Bewegung inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit  $100\ \mu\text{l}$  CD34-*Micro beads* je  $10^8$  Zellen für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 50 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und mit  $1300\ \text{g}$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $10^8$  Zellen / ml in MACS-Puffer resuspendiert und maximal  $10^9$  Zellen auf eine zuvor mit MACS-Puffer inkubierte LS-Säule in einem magnetischen Ständer gegeben. Die Säulen wurden dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die LS-Säulen wurden aus dem magnetischen Ständer entfernt und die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer je LS Säule in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eluiert. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen entweder direkt in Versuche eingesetzt oder zur Konservierung eingefroren (siehe Abschnitt zur Kryokonservierung von Zellen)

**PBS / EDTA (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 mM EDTA

**MACS-Puffer**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 mM EDTA; 0,5 % BSA

**5.2.3 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Die CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5 % im 24-Well kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in serumfreiem Expansionsmedium (SFEM) I mit FLT3LG (100 ng / ml), IL3 (20 ng / ml), IL6 (20 ng / ml) und SCF (100 ng / ml). Die Zellzahl wurde konstant bei  $5 \times 10^5$  Zellen / ml gehalten.

**5.2.4 Kryokonservierung von Zellen**

Zum Erhalten von Zelllinien und präparierten Primärzellen wurden die Zellen mit  $1300\ \text{g}$  für 5 Minuten abzentrifugiert und  $5 \times 10^6$  Zellen / ml in Einfriermedium aufgenommen. Für die Zelllinien wurde DMEM bzw. RPMI mit FKS und DMSO im Verhältnis von 3:1:1 verwendet. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml CryoStor® CS10 aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  herunter gekühlt und für die weitere Lagerung in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad. Danach wurde das Einfriermedium mit PBS ausgewaschen. Die Zellen wurden mit  $1300\ \text{g}$  für 5 Minuten abzentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

**PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### 5.2.5 Differenzierung von Zellen

CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden nach der Isolation bzw. dem Auftauen für 4 Tage unter serumfreien Bedingungen (siehe Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen) expandiert bevor die Differenzierung induziert wurde. Für die Erythrozytdifferenzierung wurden die CD34<sup>+</sup>-Zellen in SFEM II mit Dexamethason (2 µM), EPO (1 U / ml), Estradiol (0,2 µM), IL3 (5 ng / ml), Penicillin / Streptomycin (100 U / ml) und SCF (20 ng / ml) für 10 bis 14 Tage kultiviert. Zur megakaryozytären Differenzierung wurden die CD34<sup>+</sup>-Zellen in SFEM II mit IL6 (7,5 ng / ml), IL9 (13,5 ng / ml), Penicillin / Streptomycin (100 U / ml), SCF (1 ng / ml) und TPO (30 ng / ml) für 7 bis 10 Tage kultiviert. Ein Medium, das sowohl die erythroide als auch die megakaryozytäre Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen induzieren konnte, bestand aus SFEM II mit EPO (0,5 U / ml von Tag 1 bis Tag 6; 3 U / ml ab Tag 7), Glutamin (2 mM), IL3 (10 ng / ml), IL6 (10 ng / ml), Penicillin / Streptomycin (100 U / ml), SCF (100 ng / ml) und TPO (50 ng / ml) für 17 Tage. Zu den weiteren Kulturbedingungen siehe Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen.

### 5.2.6 Serum Entzug in K562-Zellen

Für die Kultivierung von K562-Zellen unter serumfreien Bedingungen wurden 0,3 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml ausgesät und für 24 Stunden in RPMI Medium mit Glutamin (2 mM) und Penicillin / Streptomycin (100 U / ml) bei 37°C im Inkubator mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Nach dem durch Serumentzug herbeigeführten G1-Phasenarrest wurde FKS (10 %) zu den Zellen gegeben und die Genexpression mittels qPCR 0; 30; 60; 90; 120 und 360 Minuten nach der FKS-Gabe analysiert.

### 5.2.7 Transfektion

Zur Produktion von lentiviralen Partikeln wurden 1,4 x 10<sup>7</sup> HEK293T-Zellen (maximal Passage 20) je 175 cm<sup>2</sup>-Flasche in 15 ml DMEM ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen transfiziert. Ein Transfektionsansatz enthielt 28,8 µg des lentiviralen Transfer-Vektors, 18,7 µg des Verpackungsvektors M334, 10,1 µg des Verpackungsvektors VSVG und 144 µl PEI (Konzentration Stammlösung 1 mg / ml) und wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 4 Stunden nachdem der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wurde fand ein Mediumwechsel statt. Die Zellen wurden bis zu 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von Gesamtzellextrakten sowie zur Isolation von mRNA nach Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren erfolgte mit PEI (Konzentration Stammlösung 1 mg / ml). Dazu wurden 0,3 x 10<sup>6</sup> HEK293T-Zellen in 3 ml DMEM je *Well* einer 6-*Well* Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde ein Transfektionsansatz mit 1 µg Plasmid-DNA und 10 µl PEI für 20 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert und danach auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden für 48 bis 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion von HEK293T- und K562-Zellen für Promotoranalysen erfolgte mittels Metafectene®. Ausgesät wurden  $10^5$  HEK293T- bzw.  $2,5 \times 10^5$  K562-Zellen in 500  $\mu$ l des entsprechenden Mediums je 24-Well. Ein Transfektionsansatz enthielt 3  $\mu$ l Metafectene® und bis zu 1,5  $\mu$ g Plasmid-DNA und wurde nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur gleichmäßig auf zwei Wells aufgeteilt. Zur Analyse des *FUBP1* Promotors wurden jeweils 250 ng *FUBP1* Promotorkonstrukt, 250 ng E47 und 250 ng TAL1 transfiziert. Außerdem wurde das  $\beta$ -Galactosidase Plasmid mit 250 ng für HEK293T-Zellen bzw. mit 500 ng für K562-Zellen in den Transfektionsansatz gegeben. Durch die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase Aktivität wurde die Transfektionseffizienz ermittelt und diente zur Normalisierung der Luciferasewerte. Die DNA-Menge in HEK293T-Zellen wurde mit 250 ng pcDNA3 Leervektor auf 1,25  $\mu$ g eingestellt. Zur Analyse des *MYC*-Promotors wurden jeweils 250 ng des Promotorkonstrukts in HEK293T- bzw. K562-Zellen transfiziert. Das  $\beta$ -Galactosidase-Plasmid mit 250 ng für HEK293T-Zellen bzw. mit 500 ng für K562-Zellen wurde in den Transfektionsansatz gegeben und die Gesamtmenge an DNA mit dem pcDNA3 Leervektor auf 1,25  $\mu$ g je Transfektionsansatz gebracht. Die Transfektionsansätze für die Analyse des *MYC*-Promotors in Anwesenheit von shRNA enthielten jeweils 250 ng des *MYC*-Promotorkonstrukts, jeweils 750 ng des shRNA-Konstrukts und 500 ng  $\beta$ -Galactosidase-Plasmid. Die Promotoranalyse wurde 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Für Immunopräzipitationsexperimente wurden  $2,5 \times 10^6$  HEK293T-Zellen 24 Stunden vor Transfektion in 10 ml DMEM in 10 cm-Schalen ausgesät. Transfiziert wurde mit 50  $\mu$ l PEI (Konzentration Stammlösung 1 mg / ml). Zur Untersuchung der Interaktion von FUBP1 mit TAL1 wurden jeweils 5  $\mu$ g pcDNA3 FUBP1 His und pcDNA3 TAL1 Flag alleine sowie ko-transfiziert. Die DNA-Menge wurde mit dem Leervektor pcDNA3 auf 10  $\mu$ g aufgefüllt. Nach 20-minütiger Inkubation des Transfektionsansatzes wurde dieser auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 4 Stunden Inkubation. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in Immunopräzipitationsexperimenten eingesetzt.

### **5.2.8 Transduktion**

Virale Partikel befanden sich im Medium von HEK293T-Zellen, die mit den entsprechenden lentiviralen Transfer- und Verpackungsvektoren transfiziert wurden. Das Medium der transfizierten Zellen wurde 24 und 48 Stunden nach der Transfektion gesammelt und bis zur Aufkonzentrierung bei 4°C gelagert. Die Konzentration der viralen Partikel erfolgte durch Ultrazentrifugation. Dazu wurden die Zellreste aus dem Medium mit 1400 g für 3 Minuten abzentrifugiert und durch einen 42  $\mu$ m-Filter steriltfiltriert. In ein Zentrifugierrohrchen wurden 30 ml des Überstandes gegeben und mit 5 ml Saccharose

(20 %; sterilfiltriert) unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte mit dem Rotoreinsatz SW-Ti 32 (BD) mit 25000 rpm bei 4°C für 2 Stunden. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und Flüssigkeitsreste im Zentrifugenröhrchen mit einem Ethanol getränkten Papiertuch aufgenommen. Das Viruspellet wurde in 500 µl SFEM I bei 4°C für 1 Stunde gelöst und danach entweder direkt zur Transduktion eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Transduziert wurde mit einer MOI von ca. 25. K562-Zellen wurden mit  $1,4 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml RPMI je 6-Well ausgesät und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 100 µl konzentrierter Virus und 30 µl Protaminsulfat (Konzentration Stammlösung 0,4 mg / ml; sterilfiltriert) in jedes Well gegeben und die Zellen mit 2000 g für 90 Minuten bei 32°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Volumen auf 4 ml je Well mit RPMI aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 1400 g für 3 Minuten abzentrifugiert und das Medium abgenommen. Die Zellen wurden in 1,5 ml frischem Medium aufgenommen und die Transduktion wie oben beschrieben erneut durchgeführt. 24 Stunden nach der zweiten Transduktion wurde das Medium gewechselt und die Zellen in einem geeigneten Volumen Medium im Brutschrank inkubiert. Die Transduktionseffizienz wurde 48 Stunden nach der zweiten Transduktion durch die Fluoreszenz-unterstützte Zellsortierungs-Analyse (FACS) des auf dem lentiviralen Vektor enthaltenen Reportergens GFP ermittelt. CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden wie oben beschrieben transduziert. Dabei wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 500 µl SFEM I mit 50 µl Viruskonzentrat und 5 µl Protaminsulfat mit 1400 g für 60 Minuten bei 32°C zentrifugiert. Bei einer Transduktionseffizienz unter 90 % wurden die Zellen mittels FACS-Sortierung selektiert.

### **5.2.9 FACS Analyse**

Die FACS-Analyse der GFP-Expression bzw. der Expression von Oberflächenantigenen von Zellen erfolge am Durchflusszytometer FACSCanto® mit der FACSDiva® Software. Für die Färbung wurden  $10^5$  Zellen im FACS-Röhrchen mit PBS gewaschen und mit 1400 g für 3 Minuten abzentrifugiert. Zum Blockieren wurden die Zellen 5 Minuten mit FCR *blocking reagent* bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die spezifischen FACS-Antikörper (siehe Tabelle 5.4) nach Herstellerangaben hinzugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde mit einem Waschschrift mit PBS und nachfolgender Zentrifugation mit 1400 g bei 4°C für 3 Minuten entfernt. Die Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und in die FACS-Analyse eingesetzt.

**Tabelle 5.4: Auflistung der verwendeten FACS Antikörper.** APC - Allophycocyanin.

Bezeichnung	Organismus	Isotyp	Hersteller	Ort
CD34-APC	human	Maus IgG2a	Miltenyi	Bergisch Gladbach
CD41-APC	human	Maus IgG1	BioLegend®	Fell
CD41- <i>Pacific Blue</i> ™	human	Maus IgG1	BioLegend®	Fell
CD235a-APC	human	rekombinant, Mensch IgG1	Miltenyi	Bergisch Gladbach

**PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**5.2.10 Durchflusszytometrie-Sortierung von GFP-positiven Zellen**

Die Selektion von transduzierten Zellen, welche das auf den lentiviralen Vektoren codierte Reporter-gen GFP exprimierten, erfolgte mittels Durchflusszytometrie-Sortierung am Durchflusszytometer 48 Stunden nach der zweiten Transduktion. Zur Vorbereitung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1400 g für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml in MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch ein Zellsieb in ein FACS-Röhrchen auf Eis filtriert und am FACSria® Durchflusszytometer sortiert. Durchgeführt wurde die Sortierung von Dr. Stefan Stein bzw. Tefik Merovci (FACS Service, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Aufgenommen wurden die Zellen in Nährmedium mit 3 % Penicillin / Streptomycin und 100 µg / ml Primocin™. Nach der Sortierung wurden die Zellen dreimal mit PBS / 3 % Penicillin / Streptomycin gewaschen und mit 1400 g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in dem entsprechenden Nährmedium (1 % Penicillin / Streptomycin; 100 µg / ml Primocin™) kultiviert, bevor sie in weitere Versuche eingesetzt wurden.

**PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**MACS-Puffer**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM EDTA; 0,5 % BSA

**5.2.11 Methylzellulose Colony formation assay**

Die Aussaat von CD34<sup>+</sup>-Zellen für den *Colony formation assay* erfolgte 24 Stunden nach deren FACS-Sortierung in zwei Doppelansätzen. In einen Doppelansatz wurden 5 x 10<sup>3</sup> Zellen in 210 µl SFEM I mit 90 µl Penicillin / Streptomycin (Konzentration Stammlösung 10<sup>4</sup> Units / ml; 10<sup>4</sup> µg / ml) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde gut mit 3 ml MethoCult™ Classic Methylcellulose gemischt und anschließend auf zwei 3 cm-Zellkulturschalen mit Gitterraster aufgeteilt. Nach 9 bis 12 Tagen wurden die Kolonien am Mikroskop analysiert und ausgezählt.

## 5.3 Molekularbiologische Methoden

### 5.3.1 DNA / RNA-Standardmethoden

Die Molekularbiologischen Standardmethoden Kultur von *E. coli*, Polymerasekettenreaktion und Agarosegelelektrophorese erfolgten nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989), wenn nicht anders angegeben. Die weiteren Methoden der Plasmid-DNA-Extraktion, Aufreinigung von PCR-Produkten, RNA-Extraktion, reverse Transkription von RNA in cDNA (RT) wurde mit den in Tabelle 5.5 aufgeführten *Kits* nach Herstellerangaben durchgeführt.

**Tabelle 5.5: Auflistung der verwendeten *Kits*.**

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller	Ort
ChIP DNA Clean & Concentrator™ Kit	Aufreinigung ChIP-DNA	Zymo Research	Freiburg
GeneJET™ Plasmid Miniprep	Plasmid-DNA Extraktion aus 3 ml-Kulturen	Thermo Fisher Scientific	Waltham
GeneJET™ PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Omniscript® RT	reverse Transkription von mRNA aus cDNA	Quiagen	Hilden
PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit	Plasmid-DNA Extraktion aus 100 ml-Kulturen	Thermo Fisher Scientific	Waltham
RNeasy® Mini Kit	RNA Extraktion aus eukaryotischen Zellen	Quiagen	Hilden

Der Tabelle 5.6 sind die zur Klonierung verwendeten Enzyme zu entnehmen.

**Tabelle 5.6: Auflistung der verwendeten Enzyme.**

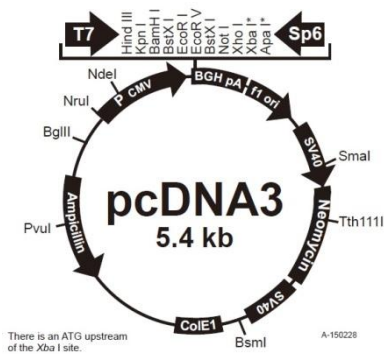
Bezeichnung	Anwendung	Hersteller	Ort
<i>AgeI</i>	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
<i>Bam</i> HI	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
<i>Eco</i> RI	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
<i>Hind</i> III	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
<i>Kpn</i> I	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
<i>Mlu</i> I	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	(Mutagenese) PCR	New England Biolabs	Ipswich
<i>Sac</i> I	Restriktion	New England Biolabs	Ipswich
T4 DNA Ligase	Ligation	New England Biolabs	Ipswich
T4 Polynucleotide Kinase	Phosphorylierung	New England Biolabs	Ipswich

### 5.3.2 Expressionsvektoren

#### pcDNA3 Vektor

In den pcDNA3 Vektor (siehe Abbildung 5.1; Invitrogen, Darmstadt) klonierte Gene stehen unter der Kontrolle des Promotors des humanen Cytomegalievirus (CMV). Zwei

Resistenzkassetten dienen der Selektion, die durch das Ampicillin-Resistenzgen in Bakterien und eine Neomycinresistenz in Säugetierzellen erreicht wird. Zusätzlich wurden ein His- bzw. ein Flag-Affinitätstag eingefügt, so dass die entsprechenden Fusionsproteine exprimiert werden. Mit dem Plasmid pcDNA3 FUBP1 His lässt sich die Isoform 2 des humanen FUBP1 mit einem C-terminal lokalisierten Penta-His-Affinitätstag exprimieren und wurde von Dr. Stefanie Hauck (AG Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Das pcDNA3 TAL1 Flag Konstrukt codiert für das humane TAL1 mit einem N-terminalen Flag-Affinitätstag mit der Sequenz GACTACAAAGACGATGACGACAAG. Dieses Konstrukt wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg / Hessen, Frankfurt) generiert. Zur Sequenzierung wurden die in Tabelle 5.7 angegebenen Primer verwendet.



**Abbildung 5.1: Karte des pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Darmstadt).** Der pcDNA3 Vektor ist zur transienten Expression in Säugetierzellen geeignet. Zusätzlich wird ein His-Affinitätstag C-terminal von der multiplen Klonierungsstelle bzw. ein Flag-Affinitätstag in deren N-Terminus exprimiert.

**Tabelle 5.7: Verwendete Primer zur Sequenzierung des pcDNA3 Vektors.**

Bezeichnung	Orientierung	Nukleotidsequenz 5'→3'	T <sub>m</sub> [C°]
sp6-pcDNA3-seq	forward	GCATTTAGGTGACACTATAG	53,3
BGH R	reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56,0

### SEW Vektor

Zur transienten shRNA Expression in Säugetierzellen durch lentivirale Transduktion wurde der SEW Vektor (siehe Abbildung 5.2; Demaison *et al.*, 2002) verwendet. Die Expression der shRNA Sequenz sowie des zur Selektion in Säugetierzellen verwendeten GFP reguliert der Promotor des *spleen focus-forming Virus* (SFFV). Die Selektion in Bakterien ermöglicht ein Ampicillin-Resistenzgen. Für den *knock down* von *TAL1* wurde die Sequenz ACCTCGACAAGAAGCTCAGCAAGAATTCAAGAGATTCTTGCTGAGCTTCTTGCTTTTT mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor kloniert (Benjamin Koch, AG Lausen, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg / Hessen, Frankfurt). Für den *knock down* von *FUBP1* wurden die Sequenzen

GATCCCCGGCAGGAACGGATCCAAATTTCAAGAGAATTTGGATCCGTTCTGCCTTTTT  
GGAAA (*forward*) und  
AGCTTTTCCAAAAGGCAGGAACGGATCCAAATTCTTTGAAATTTGGATCCGTTCTGC  
CGGG (*reverse*) verwendet (Dr. Stefanie Hauck, AG Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt).  
Die Primer zur Sequenzierung sind Tabelle 5.8 zu entnehmen.



**Abbildung 5.2: Karte des SEW Vektor zur Produktion lentiviraler Partikel (Demaison *et al.*, 2002).** Mit dem SEW Vektor können Säugetierzellen lentiviral transduziert werden. Die Expression von shRNA sowie von GFP wird vom Promotor des *spleen focus-forming Virus* (SFFV) kontrolliert

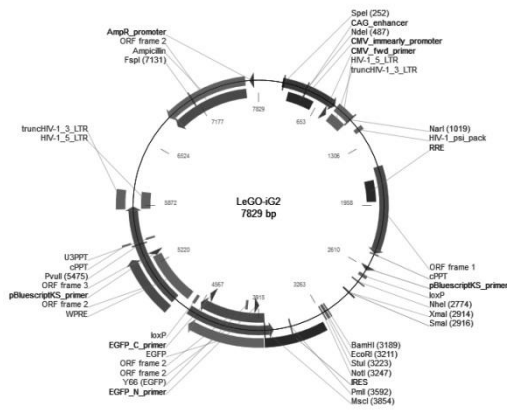
**Tabelle 5.8: Verwendete Primer zur Sequenzierung des SEW Vektors.**

Bezeichnung	Orientierung	Nukleotidsequenz 5'→3'	T <sub>m</sub> [C°]
SEWfor	<i>forward</i>	ATTACAGGGACAGCAGAGATC	57,9
SEWrev	<i>reverse</i>	GATCTACAGCTGCCTTGTAAG	57,9

### LeGO iG2 Vektor

Die Überexpression in Säugetierzellen wurde durch lentivirale Transduktion mit dem LeGO iG2-Konstrukt (siehe Abbildung 5.3; Weber *et al.*, 2008) erreicht. In den Vektor klonierte Gene stehen unter der Kontrolle des SFFV-Promotors. Außerdem ist die Sequenz für eGFP auf dem Vektor codiert. Zur Selektion in Bakterien dient das Ampicillin-Resistenzgen. Für die Expression von humanem TAL1 wurde die TAL1-Sequenz per PCR zusätzlich mit den Schnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI (siehe Tabelle 5.9) aus dem pcDNA3 TAL1 Flag-Konstrukt amplifiziert und in den LeGO iG2 Vektor ligiert. Zur Sequenzierung wurden die in Tabelle 5.10 angeführten Primer verwendet.





**Abbildung 5.3: Karte des LeGO iG2 Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel (Weber et al., 2008).** Auf dem LeGO iG2 Vektor codierte Gene können mittels lentiviraler Transduktion in Säugetierzellen überexprimiert werden. Dabei wird die Expression des eGFP-Fusionsproteins vom spleen focus-forming Virus (SFFV) reguliert.

**Tabelle 5.9: Verwendete Primer zur Klonierung in den LeGO iG2 Vektor.**

Gen	Orientierung	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'	T <sub>m</sub> [C°]
TAL1	forward	BamHI	ATATGGATCCATGGCCACCGAGCGGCCGCCG	>75
TAL1	reverse	EcoRI	ATATGAATTCTCACCGAGGGCCGGCTCCATC	70,8

**Tabelle 5.10: Verwendete Primer zur Sequenzierung des LeGO iG2 Vektors.**

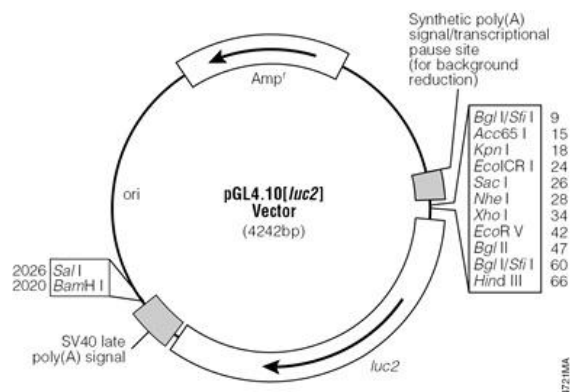
Bezeichnung	Orientierung	Nukleotidsequenz 5'→3'	T <sub>m</sub> [C°]
pLeGO fw MCS	forward	CGCTTCTGCTTCCCGAGCTCTATAA	64,6
pLeGO rev	reverse	TCCGGGCCCTCACATTGCCA	63,5

### 5.3.3 Reportergene

#### pGL4.10 Vektor

Grundlage für Promotoranalysen war der pGL4.10 Vektor (siehe Abbildung 5.4). Er enthält keinen eigenen Promotor, in die multiple Klonierungsstelle lassen sich aber jedwede Promotorsequenzen einfügen. Durch die Expression des 3' von der multiplen Klonierungsstelle lokalisierten Luciferase-Reportergens (*luc2* aus *Photinus pyralis*) kann die Aktivität der eingefügten Sequenzen gemessen werden. Zur Selektion in Bakterien wird ein Ampicillin Resistenzgen exprimiert. Aus genomischer DNA wurden mittels PCR Fragmente (-1,5 kB; -1,0 kB; -0,5 kB) aus dem Promotorbereich des humanen *FUBP1* mit den Restriktionsstellen der Enzyme *KpnI* und *HindIII* amplifiziert und in den pGL4.10 Vektor eingefügt (Dr. Katharina Gerlach, AG Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Auf dem pGL4.10 Fragment mit 0,5 kB des *FUBP1* Promotors wurde die enthaltene E-box mittels *site directed mutagenesis* mutiert (Primer siehe Tabelle 5.13). Für die Promotorkonstrukte von *MYC* wurden mit den in Tabelle 5.13 aufgeführten Primern aus genomischer DNA von K562-Zellen Fragmente (-2,0 kB; -1,5 kB; -1,0 kB; -0,5 kB) aus dem Promotorbereich des humanen *MYC*-Gens mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen amplifiziert und in den pGL4.10 Vektor eingefügt (Dr. Olga Lausen, AG Lausen, DRK-

Blutspendedienst Baden-Württemberg / Hessen, Frankfurt). Zusätzlich wurde das pGL4.10-Konstrukt, welches 2 kB des MYC-Promotorbereiches enthielt, ohne die kritische FUSE-Sequenz ( $\Delta$ cFUSE) bzw. ohne die ausreichende FUSE-Sequenz ( $\Delta$ sFUSE) mit den in Tabelle 5.13 angegebenen  $\Delta$ -Primern in einer PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die zu deletierende Sequenz so flankierten, dass diese in einer PCR nicht amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden mit der T4 *Polynucleotide Kinase* phosphoryliert, damit sie anschließend in einer Ligationsreaktion zusammengefügt werden konnten. Zur Sequenzierung wurden die Primer aus Tabelle 5.14 verwendet.



**Abbildung 5.4: Karte des pGL4.10 Vektor für die Promotoranalyse (Promega, Madison).** In Säugetierzellen kann mit diesem Vektor eine hohe Expression erreicht werden. Durch das Luciferase-Reportergen (*luc2* aus *Photinus pyralis*) kann die Aktivität beliebiger Promotorfragmente analysiert werden.

**Tabelle 5.13: Verwendete Primer zur Klonierung in den pGL4.10 Vektor.**

Region	Orientierung	Enzym	Nukleotidsequenz 5'-->3'	T <sub>m</sub> [C°]
<i>FUBP1</i> E-box	forward		CACAGTCGCAGTTAACTAGCCACTATCACC	68,1
<i>FUBP1</i> E-box	reverse		GGTGATAGTGGCTAGTTAACTGCGACTGTG	68,1
MYC, -2,0 kB	forward	<i>SacI</i>	AGCTGAGCTCTTGGAGGTGGTGGAGGGAGAG	73,5
MYC -1,5 kB	forward	<i>KpnI</i>	GTACGGTACCCACAGGGCGCAAAGGGGATTTG	74,5
MYC -1,0 kB	forward	<i>KpnI</i>	GTACGGTACCCCTCCACTCTCCCTGGGAC	73,7
MYC -0,5 kB	forward	<i>KpnI</i>	GTACGGTACCCCGCCACCGCCGGGCCCC	>75
MYC -1 b	reverse	<i>HindIII</i>	AGCTAAGCTTCGTCTAAGCAGCTGCAAGGAG	69,5
MYC $\Delta$ cFUSE	forward		GGAATATACATTATATATTAATATAGATC	54,5
MYC $\Delta$ cFUSE	reverse		TTTTTATTTTGTGTTATTCCACGG	54,2
MYC $\Delta$ sFUSE	forward		CATTATATATTAATATAGATCATTTCAG	54,0
MYC $\Delta$ sFUSE	reverse		TTATTCCACGGCATGAAAAAC	54,0

**Tabelle 5.14: Verwendete Primer zur Sequenzierung des pGL4.10 Vektors.**

Bezeichnung	Orientierung	Nukleotidsequenz 5'-->3'	T <sub>m</sub> [C°]
pGL for	forward	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	57,0
pGL rev	reverse	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	57,0

### 5.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde die mRNA aus Zellen mit dem *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) isoliert und mit dem *Omniscript RT Kit* (Quiagen) zu cDNA umgeschrieben. Die Synthese der cDNA erfolgte mit *Hexanukleotid Random-Primern* (Carl Roth). Ein qPCR-Ansatz enthielt 11 µl H<sub>2</sub>O; 0,25 µl *forward-Primer* (10 pmol / µl), 0,25 µl *reverse-Primer* (10 pmol / µl; siehe Tabelle 5.15); 12,5 µl *SYBR Green-Mix* (Eurogentec) und 1 µl cDNA bzw. ChIP-DNA und wurde jeweils in ein *well* einer 96 *well*-Platte (Kisker Gbr.) pipettiert. Die 96 *well*-Platte wurde vor der Messung mit 1000 g für 1 Minute zentrifugiert. Gemessen wurde in Duplikaten bzw. Triplikaten im Light Cycler 480 (Roche; siehe Tabelle 5.16; Tabelle 5.17). Zur Berechnung der mRNA-Expression wurde die  $\Delta\Delta$ CT-Methode angewandt (Livak *et al.*, 2001; Pfaffl *et al.*, 2001). Die relative Expression wurde auf die Werte der Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) bzw. des TATA-*binding*-Proteins (*TBP*) normalisiert. Die Werte des entsprechenden Kontrollansatzes wurden gleich 1 gesetzt und die Werte der zu messenden Gene relativ dazu berechnet.

Die Quantifizierung der DNA aus einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) erfolgte in Triplikaten, wobei in jede Reaktion 2 µl der isolierten ChIP-DNA eingesetzt wurden. Die Werte für % *Input* wurden nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Input} = 100 \times 2^{Ct(100\% \text{ Input}) - Ct(IP)}$$

Für die Ermittlung der Werte für die Anreicherung im Vergleich zu IgG wurden die angepassten Ct-Werte % *Input* (Antikörper) auf den angepassten Ct-Wert % *Input* (IgG) normiert.

**Tabelle 5.15: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qPCR von cDNA und ChIP-DNA.** Prom-Promotor; T<sub>m</sub> - Schmelztemperatur.

Region	Orientierung	Anwendung	Nukleotidsequenz 5'-->3'	T <sub>m</sub> [C°]
BIK	<i>forward</i>	Expression	CTTGATGGAGACCCTCCTGTATG	62,4
BIK	<i>reverse</i>	Expression	AGGGTCCAGGTCTCTTCAGA	61,8
CD41	<i>forward</i>	Expression	AATGGCCCCTGCTGTCGTGC	63,5
CD41	<i>reverse</i>	Expression	TGCACGGCCAGCTCTGCTTC	63,5
CD71	<i>forward</i>	Expression	AGGACGCGCTAGTGTCTTC	59,4
CD71	<i>reverse</i>	Expression	CCAGGCTGAACCGGTATATG	61,8
GAPDH	<i>forward</i>	Expression	TCTTTTTCGTCGCCAGCCGAGC	65,8
GAPDH	<i>reverse</i>	Expression	TGACCAGGCGCCCAATACGACC	65,8
GPA	<i>forward</i>	Expression	CCCTCCAGAAGAGGAAACCGGAGA	66,1
GPA	<i>reverse</i>	Expression	GGCACGTCTGTGTCAGGTGAGG	65,8
FUBP1	<i>forward</i>	Expression	ACTCCAATGGGACCATAAACCT	62,7
FUBP1	<i>reverse</i>	Expression	CAGCCCAAGCTGCTGAATTTGGAT	62,7
FUBP1 Prom P1	<i>forward</i>	ChIP	TCCTCACGATTCCCTGGAGCTTAC	62,4
FUBP1 Prom P1	<i>reverse</i>	ChIP	ACTTCAGTTACCAAGTAATGCCAGA	59,7
FUBP1 Prom P2	<i>forward</i>	ChIP	CACCACCCAAACACAGTCGC	57,3
FUBP1 Prom P2	<i>reverse</i>	ChIP	TTTTGGCACCTCCTCTCCGC	59,4
FUBP1 Prom P3	<i>forward</i>	ChIP	AGCAGCCTTTTTCTGGGCGG	61,4
FUBP1 Prom P3	<i>reverse</i>	ChIP	CGACTCTGAACTGAGAGGCAGA	62,1
FUBP1 Prom P4	<i>forward</i>	ChIP	TGTA TAGGTGCTGGGCATTTTT	58,9
FUBP1 Prom P4	<i>reverse</i>	ChIP	GTTCTTCAACTGTCCCGGTAA	60,3
MYC	<i>forward</i>	Expression	CAGCTGCTTAGACGCTGGATT	59,8
MYC	<i>reverse</i>	Expression	GTAGAAATACGGCTGCACCGA	59,8
MYC Prom P1	<i>forward</i>	ChIP	TTAACACTTGAACGCTGAGCTGC	
MYC Prom P1	<i>reverse</i>	ChIP	AATTCGGGGGAAAGGGGTGC	
MYC Prom P2	<i>forward</i>	ChIP	CTGTTCCGCCTGCGATGATTT	
MYC Prom P2	<i>reverse</i>	ChIP	AACCCTCTCCCTTTCTCTGCTG	
MYC Prom P3	<i>forward</i>	ChIP	GGCCGGTCGGACATTCTCTG	
MYC Prom P3	<i>reverse</i>	ChIP	CACAGGCGATATGCGGTCCC	
p21	<i>forward</i>	Expression	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	59,8
p21	<i>reverse</i>	Expression	CCGGCGTTTGGAGTGGTA	58,2
TAL1	<i>forward</i>	Expression	TCGGCAGCGGGTTCTTTGGG	63,5
TAL1	<i>reverse</i>	Expression	CCATCGCTCCCGGCTGTTGG	65,5
TBP	<i>forward</i>	Expression	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	64,0
TBP	<i>reverse</i>	Expression	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC	66,0

**Tabelle 5.16: qPCR-Programm für die Messung von cDNA.**

Schritt #	Programmschritt	Temperatur [C°]	Dauer	Zyklen
1	Aktivierung Polymerase	95	10 m	1
2	Denaturierung	95	30 s	60
3	Primeranlagerung	58	30 s	
4	DNA Synthese	72	30 s	
5	Messung	72	1 s	1
	Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	

**Tabelle 5.17: qPCR-Programm für die Messung von ChIP-DNA.**

Schritt #	Programmschritt	Temperatur [C°]	Dauer	Zyklen
1	Aktivierung Polymerase	95	5 m	1
2	Denaturierung	95	20 s	40
3	Primeranlagerung	60	20 s	
4	DNA Synthese	72	20 s	
5	Messung	78	1 s	1
	Schmelzkurve	60-95	Messung alle 5°C	

## 5.4 Proteinbiochemische Methoden

### 5.4.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten aus transfizierten HEK293T-Zellen erfolgte 48 Stunden nach deren Transfektion. K562-Zellen wurden 96 Stunden nach deren zweiter Transduktion geerntet. HEK293T-Zellen wurden mit PBS aus ihrem Kulturgefäß abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. K562-Zellen wurden direkt überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1400 g für 3 Minuten abzentrifugiert. Ca.  $10^6$  Zellen wurden in 100 µl Lysepuffer I resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert, wobei die Zellen alle 15 Minuten resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Zelltrümmer mit 14000 g bei 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert und der Überstand nach der Konzentrationsbestimmung am Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000) bei -80°C gelagert.

#### PBS (pH 7,5)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### Lysepuffer I

50 mM Tris (pH 7,4); 100 mM NaCl; 10 % (v / v) Glycerin; 0,1 % (v / v) Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM EDTA (pH 8,0)

### 5.4.2 Promotoranalysen

Für die Analyse der Promotoraktivität wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion (siehe Abschnitt Transfektion) geerntet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1400 g für 3 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 110 µl Lysepuffer II resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden mit 14000 g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Jeweils 20 µl des Überstandes der K562-Zellen und 10 µl des Überstandes der HEK293T-Zellen wurden in ein *Well* einer 96-*Well*-Platte vorgelegt, wobei in Duplikaten gemessen wurde. Die Luciferaseexpression wurde im Luminometer (MicroLumat LB96P, Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt, wobei Luciferase-Puffer eingesetzt wurde. Dabei katalysiert die Luciferase die Oxidation ihres Substrates Luciferin, bei der Licht emittiert wird, welches bei 562 nm gemessen wird. Für die Bestimmung des Hintergrundwertes wurde als Kontrolle Lysepuffer II eingesetzt. Um die Transfektionseffizienz zu ermitteln wurde die Aktivität der ko-transfizierten β-Galactosidase ermittelt, auf deren Wert die Luciferase Werte normiert wurden. Dazu wurden jeweils 20 µl der K562-Zelllysate und 10 µl der HEK293T-Zelllysate in Duplikaten in *Wells* einer 96-*Well*-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl des β-Galactosidase-Puffers hinzugegeben. Durch die Hydrolyse des *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG) zu Galaktose und *ortho*-Nitrophenol durch die β-Galactosidase verfärbt sich die Lösung gelb. Die Färbung wurde am Spektrometer (SPECTRAMax™ 340) bei einer

Wellenlänge von 420 nm nach 10 bis 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur oder 37°C mit dem Programm *SPF SoftMaxPro* gemessen.

**PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Lysepuffer II**

50 mM Tris (pH 7,4); 50 mM NaCl; 1 % (v / v) Triton X-100

**Luciferase-Puffer**

21,625 mM Gly Gly; 1 mM ATP (pH 7,5); 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,075 mM Luciferin

**β-Galactosidase-Puffer**

11,1 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM β-Mercaptoethanol; 3,25 mM ONPG; 74,4 mM Natriumphosphat (pH 7,5)

**5.4.3 Western Blot-Analyse / Immunoblot**

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Transferpuffer durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1 x Roti®-Block in PBS unter Bewegung blockiert. Die 1 x Roti®-Block-Lösung wurde auch zum Ansetzen der Antikörper verwendet. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 5.19) erfolgte unter Bewegung bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBST bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5.20) erfolgte unter Bewegung bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit PBST bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem *ECL Western Blotting Detection Reagent* an der Geldokumentation.

**SDS-Laufpuffer**

2,5 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 0,1 % SDS

**Transferpuffer**

2,5 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 20 % MeOH

**PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBST (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 % Tween20

**Tabelle 5.19:** Liste der in dieser Arbeit für Western Blot-Analysen (WB) oder zur Immunopräzipitation (IP) verwendeten Primärantikörper. HRP– *Horseradish peroxidase*.

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Beschreibung
anti-Aktin	Kaninchen, polyklonal	1:1000 im WB	Abcam, ab1801	Epitop im C-Terminus des humanen Aktin; 1 µg / µl
anti-α-Tubulin	Maus, monoklonal	1:5000 im WB	Abcam, ab7291	Antikörper gegen Aminosäure 426-450 des humanen Tubulin; 1 µg / µl
anti-Biotin-HRP	Ziege, polyklonal	1:5000 im WB	Sigma Aldrich, A4541	HRP-gekoppelter Antikörper gegen Biotin
anti-c-MYC	Kaninchen, polyklonal	1:2000 im WB	Santa Cruz, sc-764 x	Antikörper gegen Aminosäure 1-262 des humanen c-MYC; 2 µg / µl
anti-FUBP1	Kaninchen, monoklonal	5 µg / IP	Abcam, ab192867	Antikörper gegen ein synthetisches Peptid im Bereich von Aminosäure 50-150 des humanen FUBP1; 2 µg / µl
anti-FUBP1	Kaninchen, monoklonal	1:4000 im WB	Abcam, ab181111	Antikörper gegen ein synthetisches Peptid im Bereich von Aminosäure 1-600 des humanen FUBP1; 0,5 µg / µl
anti-E47	Maus, monoklonal	1:1000 im WB	Santa Cruz, sc-133075	Antikörper gegen Aminosäure 1-649 des humanen E47; 0,2 µg / µl
anti-Flag	Maus, monoklonal	1:2000 im WB	Sigma Aldrich, F3165	Antikörper gegen das Flag-Peptid DYKDDDDK; 4,2 µg / µl
anti-HA	Maus, monoklonal	1:1000 im WB	Covance, MMS101P	Antikörper gegen das HA-Peptid CYPYDVPDYASL; 1 µg / µl
anti-Lamin B1	Kaninchen, polyklonal	1:1000 im WB	Abcam, ab16048	Antikörper gegen ein synthetisches Peptid im Bereich von Aminosäure 400-500 des murinen LaminB1; 1 µg / µl
anti-RNA Pol II	Kaninchen, polyklonal	2,4 µg / IP	Abcam, ab26721	Antikörper gegen das synthetische Peptid YSPTSPS der humanen RNA Polymerase II CTD; 0,5 µg / µl
anti-TAL1	Kaninchen, polyklonal	5 µg / IP	OriGene, TA590662-OR	Epitop im N-Terminus des humanen TAL1; 1,1 µg / µl
anti-TAL1	Maus, monoklonal	1:500 im WB	Merck Millipore, 04-123	Epitop im C-Terminus des humanen TAL1; 1 µg / µl

**Tabelle 5.20:** Liste der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen (WB) verwendeten mit *Horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Beschreibung
anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:5000 im WB	Santa Cruz sc-2005	Anti-Maus IgG mit HRP gekoppelt; 200 µg / 0,5 ml
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5000 im WB	Santa Cruz sc-2004	Anti-Kaninchen IgG mit HRP gekoppelt; 200 µg / 0,5 ml
anti-Ziege IgG-HRP	Esel	1:5000 im WB	Santa Cruz sc-2020	Anti-Ziege IgG mit HRP gekoppelt; 200 µg / 0,5 ml

#### 5.4.4 Chromatin-Immunopräzipitation

Für die Herstellung der Lysate für eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurden  $10^7$  K562- oder CD34<sup>+</sup>-Zellen in 10 ml RPMI-Medium ohne Zusätze eingesetzt. Die Verknüpfung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte durch die Inkubation der Zellen mit 0,75 % Formaldehyd unter Bewegung bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von Glycin mit einer Endkonzentration von 125 mM und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten abgestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1200 g bei 4°C für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit kaltem PBS für 10 Minuten unter Bewegung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1,2 ml ChIP-Lysepuffer resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis unter Bewegung inkubiert. Zur Fragmentierung des Chromatins auf eine Größe von 250-1000 bp wurden die Lysate im Sonifizierer (Bioruptor) bis zu 12 Minuten bei mittlerer Intensität sonifiziert. Die Fragmentierung wurde anschließend auf einem 1,5 %-Agarosegel überprüft. Danach wurden Zelltrümmer und SDS-Präzipitat mit 8000 g bei 4°C für 4 Minuten abzentrifugiert. Die Konzentration der Chromatin-Lysate wurde nach der Zentrifugation am Spektrometer (SPECTRAMax™ 340) bestimmt. Die Chromatin-Lysate wurden direkt für ChIP-Experimente eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Je ChIP-Ansatz wurden 10-25 µg Chromatin-Lysat, 5 µg Antikörper (siehe Tabelle 5.21) bzw. IgG als Kontrolle (siehe Tabelle 5.22), Proteaseinhibitor in einfacher Konzentration und 25 µl blockierter und gewaschener Protein G *beads* eingesetzt. Zur Vorbereitung waren 50 µl der *beads* zuvor mit RIPA<sup>-</sup>-Puffer gewaschen und für 60 Minuten mit Roti®-Block in RIPA<sup>-</sup>-Puffer blockiert worden. Anschließend waren die *beads* zweimal in RIPA<sup>-</sup>-Puffer gewaschen und in 300 µl RIPA<sup>-</sup>-Puffer aufgenommen worden. Das Gesamtvolumen des ChIP-Ansatzes wurde auf 500 µl aufgefüllt bei einer SDS-Endkonzentration von 0,1 % und über Nacht auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* dreimal mit Waschpuffer I und dreimal mit Waschpuffer II gewaschen. Zur Elution wurden die *beads* in 120 µl für 30 Minuten Elutionspuffer II mit 1000 rpm bei 30°C auf dem Heizschüttler inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde eine *Input*-Probe mitgeführt. Mit der Inkubation von 1 µl RNase (Stammkonzentration 0,5 mg / ml) für 10 Minuten bei 37°C wurde vorhandene RNA abgebaut. Die Formaldehyd-Verknüpfung der Protein-DNA Komplexe wurde durch die Inkubation des Eluats mit 5 µl Proteinkinase K (Stammkonzentration 20 mg / ml) mit 750 rpm bei 65°C für 5 Stunden erreicht. Die Aufreinigung der ChIP-DNA erfolgte mit dem *ChIP DNA Clean & Concentrator*™ Kit (Zymo Research) in 40 µl Elutionspuffer aus dem Kit. Für die Analyse der ChIP-DNA wurden 2 µl je qPCR-Ansatz eingesetzt und in Triplikaten gemessen.

#### **PBS (pH 7,5)**

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

---



**ChIP-Lysepuffer**

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 140 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0); 1 % Triton X-100; 0,1 % Natrium-Deoxycholat; 0,4 % SDS; Proteaseinhibitor

**RIPA<sup>-</sup>-Puffer**

50 mM Tris-HCL (pH 8,0); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 1 % NP-40; 0,5 % Natrium Deoxycholat

**RIPA<sup>0,1 % SDS</sup>-Puffer**

50 mM Tris-HCL (pH 8,0); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 1 % NP-40; 0,5 % Natrium Deoxycholat; 0,1 % SDS

**Waschpuffer I**

20 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS

**Waschpuffer II**

20 mM Tris (pH 8,0); 500 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS

**Elutionspuffer II**

100 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1 % SDS

**Tabelle 5.21: Liste der in dieser Arbeit in der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) verwendeten Antikörper.**

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Beschreibung
anti-FUBP1	Kaninchen, monoklonal	5 µg / IP	Abcam, ab192867	Antikörper gegen ein synthetisches Peptid im Bereich von Aminosäure 50-150 des humanen FUBP1; 2 µg / µl
anti-RNA-Polymerase II	Kaninchen, polyklonal	2,5 µg / IP	Abcam, ab26721	Antikörper gegen ein synthetisches Peptid (YSPTSPS-Wiederholung) in der C-terminalen Domäne der humanen RNAP II; 0,6 µg / µl
anti-TAL1	Kaninchen, polyklonal	5 µg / IP	OriGene, TA590662-OR	Epitop im N-Terminus des humanen TAL1; 1,1 µg / µl

**Tabelle 5.22: Liste der in dieser Arbeit in der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) verwendeten Immunglobuline.**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Beschreibung
Maus IgG	5 µg / IP	Santa Cruz, sc-2025	Maus IgG; 200 µg / 0,5 ml
Kaninchen IgG	5 µg / IP	Santa Cruz, sc-2027	Kaninchen IgG; 200 µg / 0,5 ml
Ziege IgG	5 µg / IP	Santa Cruz, sc-2028	Ziege IgG; 200 µg / 0,5 ml

### 5.4.5 Sequentieller ChIP

Zur Analyse, ob zwei Transkriptionsfaktoren zusammen auf einem Promotor lokalisiert sind wurde ein sequentieller ChIP (ChIP-Re-ChIP) angewandt. Die Zellernte, Formaldehyd-Verknüpfung, das Sonifizieren und die Vorbereitung der *beads* wurde wie

unter dem Absatz „Chromatin-Immunopräzipitation“ beschrieben durchgeführt. In die erste Immunopräzipitation wurde in Triplikaten jeweils 33 µg Chromatin-Lysat, 5 µg Antikörper (Tabelle 1.21) bzw. IgG als Kontrolle (Tabelle 1.22), 30 µl blockierter und gewaschener *beads* und Proteaseinhibitor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter konstanter Bewegung bei 4°C über Nacht in einem Volumen von 500 µl mit einer Endkonzentration von SDS mit 0,1 %. Am nächsten Tag wurden die *beads* viermal mit Waschpuffer I gewaschen. Anschließend wurden die *beads* der Triplikate vereinigt und mit 100 µl Elutionspuffer I bei Raumtemperatur mit Resuspension alle 15 Minuten inkubiert. Das Eluat wurde mit 700 µl Inkubationspuffer verdünnt und 3 µg Antikörper (Tabelle 1.21) bzw. IgG als Kontrolle (Tabelle 1.22), 60 µl gewaschener und blockierter Protein G *beads* und Proteaseinhibitor hinzugegeben. Inkubiert wurde über Nacht auf dem Rotator bei 4°C. Nach dieser zweiten Präzipitation wurden die *beads* dreimal mit Waschpuffer I gewaschen und in 120 µl Elutionspuffer II aufgenommen und eine *input* Probe mitgeführt. Ab hier wurde das Protokoll wie unter „Chromatin-Immunopräzipitation“ beschrieben angewandt.

## 5.5 Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD; *standard deviation*) angegeben. Mit Ausnahme der FACS-Experimente wurden die Daten aller Versuche mit dem Programm GraphPad Prism 6 analysiert und die entsprechenden Grafiken erstellt. Da dies ein Programm für den internationalen Gebrauch ist, werden in den Achsenbeschriftungen Punkte statt Kommata für die Darstellung von Dezimalzahlen verwendet. Für die Auswertung und Darstellung der Daten aus den FACS-Experimenten wurde das Programm FlowJo V10 verwendet. Die Daten für die Expression von Genen und Proteinen in verschiedenen Zelllinien wurden [proteomics.org](http://proteomics.org) (Human Protein Atlas Version 15; 18.10.2016) entnommen (siehe Tabelle 5.23). Für die bioinformatischen Promotoranalysen wurde der UCSC *Genome Browser* (GRCh37/hg19) genutzt (siehe Tabelle 5.24).

**Tabelle 5.23: Auflistung der Internet-Links zur Proteinatlas-Seite.** Für die Expressionsanalysen von Genen und Proteinen in verschiedenen Zelllinien wurden die von [proteomics.org](http://proteomics.org) bereitgestellten Daten genutzt.

Gen / Protein	Link zur Proteinatlas-Seite
LDB1	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000198728-LDB1/cell/HPA034488">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000198728-LDB1/cell/HPA034488</a> ;
LMO2	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000135363-LMO2/cell">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000135363-LMO2/cell</a> ;
TAL1	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000162367-TAL1/cell/CAB017805">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000162367-TAL1/cell/CAB017805</a> ;
TCF12 (HEB)	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140262-TCF12/cell/CAB004432">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140262-TCF12/cell/CAB004432</a> ;
TCF3 (E12 / E47)	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000071564-TCF3/cell/HPA062476">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000071564-TCF3/cell/HPA062476</a> ;
TCF4 (E2-2)	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000196628-TCF4/cell">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000196628-TCF4/cell</a>

**Tabelle 5.24: Auflistung der Internet-Links zur UCSC-Seite.** Für die bioinformatischen Promotoranalysen wurden die Daten des UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19) genutzt.

Promotorregion	Link zur UCSC-Seite
<i>BIK</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr22%3A43502012%2D43530459&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr22%3A43502012%2D43530459&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>FUBP1</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr1%3A78405794%2D78452574&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr1%3A78405794%2D78452574&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>GATA1</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chrX%3A48643048%2D48654651&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chrX%3A48643048%2D48654651&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>GYP A</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr4%3A145022593%2D145069766&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr4%3A145022593%2D145069766&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>KLF1</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr19%3A12994541%2D12998712&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr19%3A12994541%2D12998712&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>LMO2</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr11%3A33871695%2D33922265&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr11%3A33871695%2D33922265&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>MYC</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr8%3A128746974%2D128755022&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr8%3A128746974%2D128755022&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>NOXA</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr9%3A140315094%2D140331611&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr9%3A140315094%2D140331611&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>TAL1</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr1%3A47678592%2D47698813&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr1%3A47678592%2D47698813&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>TNF</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr6%3A31542651%2D31546804&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr6%3A31542651%2D31546804&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>
<i>TRAIL</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr3%3A172218798%2D172245797&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&amp;lastVirtModeType=default&amp;lastVirtModeExtraState=&amp;virtModeType=default&amp;virtMode=0&amp;nonVirtPosition=&amp;position=chr3%3A172218798%2D172245797&amp;hgsid=565336929_2EYVmtM55GuSuu5OAWznmBwHJoEd</a>

## 6 Literaturverzeichnis

- Acosta JC, Ferrandiz N, Bretones G, Torrano V, Blanco R, Richard C, O'Connell B, Sedivy J, Delgado MD and Leon J (2008). "Myc inhibits p27-induced erythroid differentiation of leukemia cells by repressing erythroid master genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest." *Mol Cell Biol* **28**(24): 7286-7295.
- Aisen P (2004). "Transferrin receptor 1." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(11): 2137-2143.
- Alghisi E, Distel M, Malagola M, Anelli V, Santoriello C, Herwig L, Krudewig A, Henkel CV, Russo D and Mione MC (2013). "Targeting oncogene expression to endothelial cells induces proliferation of the myelo-erythroid lineage by repressing the Notch pathway." *Leukemia* **27**(11): 2229-2241.
- Anantharaman A, Lin IJ, Barrow J, Liang SY, Masannat J, Strouboulis J, Huang S and Bungert J (2011). "Role of helix-loop-helix proteins during differentiation of erythroid cells." *Mol Cell Biol* **31**(7): 1332-1343.
- Andersson LC, Gahmberg CG, Teerenhovi L and Vuopio P (1979). "Glycophorin A as a cell surface marker of early erythroid differentiation in acute leukemia." *Int J Cancer* **24**(6): 717-720.
- Andersson LC, von Willebrand E, Jokinen M, Karhi KK and Gahmberg CG (1981). "Glycophorin A as an erythroid marker in normal and malignant hematopoiesis." *Haematol Blood Transfus* **26**: 338-344.
- Anguita E, Hughes J, Heyworth C, Blobel GA, Wood WG and Higgs DR (2004). "Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2." *Embo j* **23**(14): 2841-2852.
- Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerra A, Coligan J and Kirsch IR (1990a). "The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus." *Mol Cell Biol* **10**(12): 6426-6435.
- Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS, Zhao X, Ellsworth M, Wu C, McGuire EA and Gross KW (1997). "An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice." *Embo j* **16**(9): 2408-2419.
- Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM, Cossman J, Bertness VL and Kirsch IR (1990b). "Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity." *Science* **250**(4986): 1426-1429.
- Aplan PD, Lombardi DP, Reaman GH, Sather HN, Hammond GD and Kirsch IR (1992). "Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **79**(5): 1327-1333.
- Armstrong SA and Look AT (2005). "Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia." *J Clin Oncol* **23**(26): 6306-6315.
- Aronheim A, Ohlsson H, Park CW, Edlund T and Walker MD (1991). "Distribution and characterization of helix-loop-helix enhancer-binding proteins from pancreatic beta cells and lymphocytes." *Nucleic Acids Res* **19**(14): 3893-3899.
- Astolfi A, Vendemini F, Urbini M, Melchionda F, Masetti R, Franzoni M, Libri V, Serravalle S, Togni M, Paone G, Montemurro L, Bressanin D, Chiarini F, Martelli AM, Tonelli R and Pession A (2014). "MYCN is a novel oncogenic target in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Oncotarget* **5**(1): 120-130.
- Ataie-Kachoei P, Pourgholami MH, Richardson DR and Morris DL (2014). "Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6)." *J Clin Pathol* **67**(11): 932-937.
- Avigan MI, Strober B and Levens D (1990). "A far upstream element stimulates c-myc expression in undifferentiated leukemia cells." *J Biol Chem* **265**(30): 18538-18545.
- Barminko J, Reinholt B and Baron MH (2016). "Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals." *Dev Comp Immunol* **58**: 18-29.
- Baron CB and Blough HA (1983). "Binding of influenza virus to a reconstituted receptor complex containing glycophorin." *Intervirology* **19**(1): 33-43.

- Bartosz G (1991). "Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes." *Gerontology* **37**(1-3): 33-67.
- Bash RO, Hall S, Timmons CF, Crist WM, Amylon M, Smith RG and Baer R (1995). "Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study." *Blood* **86**(2): 666-676.
- Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN and Cleveland JL (2002). "c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression." *Genes Dev* **16**(19): 2530-2543.
- Bauer C and Kurtz A (1989). "Oxygen sensing in the kidney and its relation to erythropoietin production." *Annu Rev Physiol* **51**: 845-856.
- Begley CG, Visvader J, Green AR, Aplan PD, Metcalf D, Kirsch IR and Gough NM (1991). "Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3): 869-873.
- Benyoucef A, Calvo J, Renou L, Arcangeli ML, van den Heuvel A, Amsellem S, Mehrpour M, Larghero J, Soler E, Naguibneva I and Pflumio F (2015). "The SCL/TAL1 Transcription Factor Represses the Stress Protein DDIT4/REDD1 in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells." *Stem Cells* **33**(7): 2268-2279.
- Berg EL, Mullowney AT, Andrew DP, Goldberg JE and Butcher EC (1998). "Complexity and differential expression of carbohydrate epitopes associated with L-selectin recognition of high endothelial venules." *Am J Pathol* **152**(2): 469-477.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A and Godin I (2005). "Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac." *Blood* **106**(9): 3004-3011.
- Betgegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, Rodriguez FJ, Cahill DP, McLendon R, Riggins G, Velculescu VE, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Vogelstein B, Bigner D, Yan H, Papadopoulos N and Kinzler KW (2011). "Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma." *Science* **333**(6048): 1453-1455.
- Bianchi E, Norfo R, Pennucci V, Zini R and Manfredini R (2016). "Genomic landscape of megakaryopoiesis and platelet function defects." *Blood* **127**(10): 1249-1259.
- Birbrair A and Frenette PS (2016). "Niche heterogeneity in the bone marrow." *Ann N Y Acad Sci*.
- Blackwood EM and Eisenman RN (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." *Science* **251**(4998): 1211-1217.
- Bonnet M, Loosveld M, Montpellier B, Navarro JM, Quilichini B, Picard C, Di Cristofaro J, Bagnis C, Fossat C, Hernandez L, Mamessier E, Roulland S, Morgado E, Formisano-Treziny C, Dik WA, Langerak AW, Prebet T, Vey N, Michel G, Gabert J, Soulier J, Macintyre EA, Asnafi V, Payet-Bornet D and Nadel B (2011). "Posttranscriptional deregulation of MYC via PTEN constitutes a major alternative pathway of MYC activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **117**(24): 6650-6659.
- Bosman GJ, Willekens FL and Werre JM (2005). "Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?" *Cell Physiol Biochem* **16**(1-3): 1-8.
- Bowie MB, Kent DG, Dykstra B, McKnight KD, McCaffrey L, Hoodless PA and Eaves CJ (2007). "Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5878-5882.
- Braddock DT, Baber JL, Levens D and Clore GM (2002a). "Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA." *EMBO J* **21**(13): 3476-3485.
- Braddock DT, Louis JM, Baber JL, Levens D and Clore GM (2002b). "Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA." *Nature* **415**(6875): 1051-1056.
- Branehog I, Ridell B, Swolin B and Weinfeld A (1975). "Megakaryocyte quantifications in relation to thrombokinetics in primary thrombocythaemia and allied diseases." *Scand J Haematol* **15**(5): 321-332.
- Broudy VC (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." *Blood* **90**(4): 1345-1364.
-

- Brown L, Cheng JT, Chen Q, Siciliano MJ, Crist W, Buchanan G and Baer R (1990). "Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia." *Embo j* **9**(10): 3343-3351.
- Bruce LJ, Pan RJ, Cope DL, Uchikawa M, Gunn RB, Cherry RJ and Tanner MJ (2004). "Altered structure and anion transport properties of band 3 (AE1, SLC4A1) in human red cells lacking glycophorin A." *J Biol Chem* **279**(4): 2414-2420.
- Burness AT and Pardoe IU (1983). "A sialoglycopeptide from human erythrocytes with receptor-like properties for encephalomyocarditis and influenza viruses." *J Gen Virol* **64**(Pt 5): 1137-1148.
- Busch K, Klapproth K, Barile M, Flossdorf M, Holland-Letz T, Schlenner SM, Reth M, Hofer T and Rodewald HR (2015). "Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo." *Nature* **518**(7540): 542-546.
- Cai Y, Xu Z, Xie J, Ham AJ, Koury MJ, Hiebert SW and Brandt SJ (2009). "Eto2/MTG16 and MTGR1 are heteromeric corepressors of the TAL1/SCL transcription factor in murine erythroid progenitors." *Biochem Biophys Res Commun* **390**(2): 295-301.
- Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosli G, Pietsch H, Hoang T and Leutz A (2003). "Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice." *Genes Dev* **17**(8): 959-964.
- Cantor AB and Orkin SH (2002). "Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners." *Oncogene* **21**(21): 3368-3376.
- Capellera-Garcia S, Pulecio J, Dhulipala K, Siva K, Rayon-Estrada V, Singbrant S, Sommarin MN, Walkley CR, Soneji S, Karlsson G, Raya A, Sankaran VG and Flygare J (2016). "Defining the Minimal Factors Required for Erythropoiesis through Direct Lineage Conversion." *Cell Rep* **15**(11): 2550-2562.
- Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, Goardon N, Clark K, Atzberger A, Pearce AC, Skoda RC, Ferguson DJ, Watson SP, Vyas P and Porcher C (2011). "SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis." *Blood* **118**(3): 723-735.
- Chang PY, Draheim K, Kelliher MA and Miyamoto S (2006). "NFkB1 is a direct target of the TAL1 oncoprotein in human T leukemia cells." *Cancer Res* **66**(12): 6008-6013.
- Chasis JA and Mohandas N (2008). "Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis." *Blood* **112**(3): 470-478.
- Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M and Diederich M (2011). "Erythropoietin, erythropoiesis and beyond." *Biochem Pharmacol* **82**(10): 1291-1303.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E and Speck NA (2009). "Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter." *Nature* **457**(7231): 887-891.
- Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ and Baer R (1990a). "The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein." *Embo j* **9**(2): 415-424.
- Chen Q, Yang CY, Tsan JT, Xia Y, Ragab AH, Peiper SC, Carroll A and Baer R (1990b). "Coding sequences of the tal-1 gene are disrupted by chromosome translocation in human T cell leukemia." *J Exp Med* **172**(5): 1403-1408.
- Cheng Y, Wu W, Kumar SA, Yu D, Deng W, Tripic T, King DC, Chen KB, Zhang Y, Drautz D, Giardine B, Schuster SC, Miller W, Chiaromonte F, Zhang Y, Blobel GA, Weiss MJ and Hardison RC (2009). "Erythroid GATA1 function revealed by genome-wide analysis of transcription factor occupancy, histone modifications, and mRNA expression." *Genome Res* **19**(12): 2172-2184.
- Chien HL, Liao CL and Lin YL (2011). "FUSE binding protein 1 interacts with untranslated regions of Japanese encephalitis virus RNA and negatively regulates viral replication." *J Virol* **85**(10): 4698-4706.
- Chilcote RR, Brown E and Rowley JD (1985). "Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9." *N Engl J Med* **313**(5): 286-291.
- Chung HJ and Levens D (2005). "c-myc expression: keep the noise down!" *Mol Cells* **20**(2): 157-166.

- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF and Shaper JH (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." *J Immunol* **133**(1): 157-165.
- Collu GM, Hidalgo-Sastre A and Brennan K (2014). "Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease." *Cell Mol Life Sci* **71**(18): 3553-3567.
- Costa M, Ochem A, Staub A and Falaschi A (1999). "Human DNA helicase VIII: a DNA and RNA helicase corresponding to the G3BP protein, an element of the ras transduction pathway." *Nucleic Acids Res* **27**(3): 817-821.
- Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Gothert JR and Lausen J (2012). "Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP." *Faseb j* **26**(2): 523-532.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA and Jaenisch R (2010). "Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(50): 21931-21936.
- Crispino JD, Lodish MB, MacKay JP and Orkin SH (1999). "Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex." *Mol Cell* **3**(2): 219-228.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F and Godin I (1996). "Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura." *Cell* **86**(6): 907-916.
- Cumano A and Godin I (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." *Annu Rev Immunol* **25**: 745-785.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC and Croce CM (1982). "Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(24): 7824-7827.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC and Li F (2006). "The c-Myc target gene network." *Semin Cancer Biol* **16**(4): 253-264.
- Davies C, Hogarth LA, Mackenzie KL, Hall AG and Lock RB (2015). "p21(WAF1) modulates drug-induced apoptosis and cell cycle arrest in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia." *Cell Cycle* **14**(22): 3602-3612.
- Davis-Smyth T, Duncan RC, Zheng T, Michelotti G and Levens D (1996). "The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single-strand DNA-binding transactivators." *J Biol Chem* **271**(49): 31679-31687.
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB and Weintraub H (1990). "The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation." *Cell* **60**(5): 733-746.
- de Bruijn MF, Ma X, Robin C, Ottersbach K, Sanchez MJ and Dzierzak E (2002). "Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta." *Immunity* **16**(5): 673-683.
- de Nigris F, Sica V, Herrmann J, Condorelli G, Chade AR, Tajana G, Lerman A, Lerman LO and Napoli C (2003). "c-Myc oncoprotein: cell cycle-related events and new therapeutic challenges in cancer and cardiovascular diseases." *Cell Cycle* **2**(4): 325-328.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ and et al. (1994). "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand." *Nature* **369**(6481): 533-538.
- Dean JL, Sully G, Clark AR and Saklatvala J (2004). "The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation." *Cell Signal* **16**(10): 1113-1121.
- Debeljak N and Sytkowski AJ (2012). "Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents." *Drug Test Anal* **4**(11): 805-812.
- Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J and Vainchenker W (1996). "Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow." *Blood* **88**(4): 1284-1296.

- del Senno L, Barbieri R, Amelotti F, Bernardi F, Buzzoni D, Marchetti G, Patracchini P, Piva R, Rossi M, Conconi F and et al. (1986). "Methylation and expression of c-myc and c-abl oncogenes in human leukemic K562 cells before and after treatment with 5-azacytidine." *Cancer Detect Prev* **9**(1-2): 9-15.
- Deleuze V, Chalhoub E, El-Hajj R, Dohet C, Le Clech M, Couraud PO, Huber P and Mathieu D (2007). "TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells." *Mol Cell Biol* **27**(7): 2687-2697.
- Deleuze V, El-Hajj R, Chalhoub E, Dohet C, Pinet V, Couttet P and Mathieu D (2012). "Angiopoietin-2 is a direct transcriptional target of TAL1, LYL1 and LMO2 in endothelial cells." *PLoS One* **7**(7): e40484.
- Delgado MD and Leon J (2010). "Myc roles in hematopoiesis and leukemia." *Genes Cancer* **1**(6): 605-616.
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M and Thrasher AJ (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." *Hum Gene Ther* **13**(7): 803-813.
- Ding Z, Liu X, Liu Y, Zhang J, Huang X, Yang X, Yao L, Cui G and Wang D (2015). "Expression of far upstream element (FUSE) binding protein 1 in human glioma is correlated with c-Myc and cell proliferation." *Mol Carcinog* **54**(5): 405-415.
- Dixit U, Pandey AK, Liu Z, Kumar S, Neiditch MB, Klein KM and Pandey VN (2015). "FUSE Binding Protein 1 Facilitates Persistent Hepatitis C Virus Replication in Hepatoma Cells by Regulating Tumor Suppressor p53." *J Virol* **89**(15): 7905-7921.
- Donahue RE, Yang YC and Clark SC (1990). "Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation." *Blood* **75**(12): 2271-2275.
- Dong HY, Wilkes S and Yang H (2011). "CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A." *Am J Surg Pathol* **35**(5): 723-732.
- Duncan R, Bazar L, Michelotti G, Tomonaga T, Krutzsch H, Avigan M and Levens D (1994). "A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif." *Genes Dev* **8**(4): 465-480.
- Duncan R, Collins I, Tomonaga T, Zhang T and Levens D (1996). "A unique transactivation sequence motif is found in the carboxyl-terminal domain of the single-strand-binding protein FBP." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2274-2282.
- Dzierzak E and Philipsen S (2013). "Erythropoiesis: development and differentiation." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(4): a011601.
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y and et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." *Cancer Res* **54**(5): 1169-1174.
- El Omari K, Hoosdally SJ, Tuladhar K, Karia D, Hall-Ponsele E, Platonova O, Vyas P, Patient R, Porcher C and Mancini EJ (2013). "Structural basis for LMO2-driven recruitment of the SCL:E47bHLH heterodimer to hematopoietic-specific transcriptional targets." *Cell Rep* **4**(1): 135-147.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD and Sklar J (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." *Cell* **66**(4): 649-661.
- Elwood NJ, Green AR, Melder A, Begley CG and Nicola N (1994). "The SCL protein displays cell-specific heterogeneity in size." *Leukemia* **8**(1): 106-114.
- Elwood NJ, Zogos H, Pereira DS, Dick JE and Begley CG (1998). "Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL." *Blood* **91**(10): 3756-3765.
- ENCODE PC (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." *Nature* **489**(7414): 57-74.



- Evans T and Felsenfeld G (1989). "The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein." *Cell* **58**(5): 877-885.
- Ferrando AA, Herblot S, Palomero T, Hansen M, Hoang T, Fox EA and Look AT (2004). "Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **103**(5): 1909-1911.
- Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR and Look AT (2002). "Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Cell* **1**(1): 75-87.
- Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB and Burley SK (1993). "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain." *Nature* **363**(6424): 38-45.
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M and Philipsen S (2005). "GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis." *Mol Cell Biol* **25**(4): 1215-1227.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA and Greaves MF (1990). "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells." *Blood* **75**(12): 2417-2426.
- Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC and Croce CM (1989). "Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(13): 5039-5043.
- Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J and Crossley M (1999). "Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers." *Embo j* **18**(10): 2812-2822.
- Francois S, Delabesse E, Baranger L, Dautel M, Foussard C, Boasson M, Blanchet O, Bernard O, Macintyre EA and Ifrah N (1998). "Deregulated expression of the TAL1 gene by t(1;5)(p32;31) in patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Genes Chromosomes Cancer* **23**(1): 36-43.
- Frojmark AS, Badhai J, Klar J, Thuveson M, Schuster J and Dahl N (2010). "Cooperative effect of ribosomal protein s19 and Pim-1 kinase on murine c-Myc expression and myeloid/erythroid cellularity." *J Mol Med (Berl)* **88**(1): 39-46.
- Fujiki H, Kimura T, Minamiguchi H, Harada S, Wang J, Nakao M, Yokota S, Urata Y, Ueda Y, Yamagishi H and Sonoda Y (2002). "Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture." *Exp Hematol* **30**(12): 1373-1380.
- Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K and Harigae H (2013). "Role of transcriptional corepressor ETO2 in erythroid cells." *Exp Hematol* **41**(3): 303-315 e301.
- Fujiwara T, Lee HY, Sanalkumar R and Bresnick EH (2010). "Building multifunctionality into a complex containing master regulators of hematopoiesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(47): 20429-20434.
- Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, Blahnik K, Linnemann AK, Kang YA, Choi K, Farnham PJ and Bresnick EH (2009). "Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy." *Mol Cell* **36**(4): 667-681.
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC and Orkin SH (1996). "Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12355-12358.
- Furthmayr H and Marchesi VT (1976). "Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A." *Biochemistry* **15**(5): 1137-1144.
- Gambari R, del Senno L, Piva R, Barbieri R, Amelotti F, Bernardi F, Marchetti G, Citarella F, Tripodi M and Fantoni A (1984). "Human leukemia K562 cells: relationship between hemin-mediated erythroid induction, cell proliferation and expression of c-abl and c-myc oncogenes." *Biochem Biophys Res Commun* **125**(1): 90-96.
- Geiler C, Andrade I, Clayton A and Greenwald D (2016). "Genetically Engineered In Vitro Erythropoiesis." *Int J Stem Cells* **9**(1): 53-59.
- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH and Mikkola HK (2005). "The placenta is a niche for hematopoietic stem cells." *Dev Cell* **8**(3): 365-375.

- Gekas C, Rhodes KE, Gereige LM, Helgadottir H, Ferrari R, Kurdistani SK, Montecino-Rodriguez E, Bassel-Duby R, Olson E, Krivtsov AV, Armstrong S, Orkin SH, Pellegrini M and Mikkola HK (2009). "Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis." *Blood* **113**(15): 3461-3471.
- Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan KK, Cheng C, Mu XJ, Khurana E, Rozowsky J, Alexander R, Min R, Alves P, Abyzov A, Addleman N, Bhardwaj N, Boyle AP, Cayting P, Charos A, Chen DZ, Cheng Y, Clarke D, Eastman C, Euskirchen G, Fietze S, Fu Y, Gertz J, Grubert F, Harmanci A, Jain P, Kasowski M, Lacroute P, Leng J, Lian J, Monahan H, O'Geen H, Ouyang Z, Partridge EC, Patacsil D, Pauli F, Raha D, Ramirez L, Reddy TE, Reed B, Shi M, Slifer T, Wang J, Wu L, Yang X, Yip KY, Zilberman-Schapira G, Batzoglou S, Sidow A, Farnham PJ, Myers RM, Weissman SM and Snyder M (2012). "Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data." *Nature* **489**(7414): 91-100.
- Gill G (2001). "Regulation of the initiation of eukaryotic transcription." *Essays Biochem* **37**: 33-43.
- Gnanapragasam MN, McGrath KE, Catherman S, Xue L, Palis J and Bieker JJ (2016). "EKLF/KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation." *Blood* **128**(12): 1631-1641.
- Godin I and Cumano A (2002). "The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 593-604.
- Goldfarb AN, Goueli S, Mickelson D and Greenberg JM (1992). "T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein." *Blood* **80**(11): 2858-2866.
- Goldfarb AN and Greenberg JM (1994). "T-cell acute lymphoblastic leukemia and the associated basic helix-loop-helix gene SCL/tal." *Leuk Lymphoma* **12**(3-4): 157-166.
- Golub R and Cumano A (2013). "Embryonic hematopoiesis." *Blood Cells Mol Dis* **51**(4): 226-231.
- Goswami R and Kaplan MH (2011). "A brief history of IL-9." *J Immunol* **186**(6): 3283-3288.
- Griffin MJ (1976). "Synchronization of some human cell strains by serum and calcium starvation." *In Vitro* **12**(5): 393-398.
- Grignani F, Lombardi L, Inghirami G, Sternas L, Cechova K and Dalla-Favera R (1990). "Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells." *Embo j* **9**(12): 3913-3922.
- Groves JD and Tanner MJ (1992). "Glycophorin A facilitates the expression of human band 3-mediated anion transport in *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **267**(31): 22163-22170.
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA and Gilliland DG (2005). "Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype." *Blood* **106**(2): 494-504.
- Guo Y, Niu C, Breslin P, Tang M, Zhang S, Wei W, Kini AR, Paner GP, Alkan S, Morris SW, Diaz M, Stiff PJ and Zhang J (2009). "c-Myc-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors." *Blood* **114**(10): 2097-2106.
- Gurney AL, Wong SC, Henzel WJ and de Sauvage FJ (1995). "Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5292-5296.
- Haas RJ, Hoelzer D, Kurrle E, Landenberger B and Winkler U (1976). "Experimental analysis of developing hemopoiesis in fetal bone marrow." *Pediatr Res* **10**(3): 164-168.
- Hall M and Curtis D (2005). "SCL/Tal1 and lymphoid versus myeloid lineage assignment." *Blood* **105**(3): 1365; author reply 1365-1366.
- Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, Gothert JR, Jane SM and Begley CG (2003). "The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 992-997.
- Han J, Sabbatini P and White E (1996). "Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5857-5864.

- Hanahan D and Weinberg RA (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hauck S, Hiesinger K, Khageh Hosseini S, Achenbach J, Biondi RM, Proschak E, Zornig M and Odadzić D (2016). "Pyrazolo[1,5a]pyrimidines as a new class of FUSE binding protein 1 (FUBP1) inhibitors." *Bioorg Med Chem* **24**(22): 5717-5729.
- He L, Liu J, Collins I, Sanford S, O'Connell B, Benham CJ and Levens D (2000a). "Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression." *EMBO J* **19**(5): 1034-1044.
- He L, Weber A and Levens D (2000b). "Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor." *Nucleic Acids Res* **28**(22): 4558-4565.
- Heike T and Nakahata T (2002). "Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines." *Biochim Biophys Acta* **1592**(3): 313-321.
- Herbomel P, Thisse B and Thisse C (1999). "Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo." *Development* **126**(17): 3735-3745.
- Hitchcock IS and Kaushansky K (2014). "Thrombopoietin from beginning to end." *Br J Haematol* **165**(2): 259-268.
- Hodges VM, Rainey S, Lappin TR and Maxwell AP (2007). "Pathophysiology of anemia and erythrocytosis." *Crit Rev Oncol Hematol* **64**(2): 139-158.
- Hromas R, Orazi A, Neiman RS, Maki R, Van Beveran C, Moore J and Klemsz M (1993). "Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1." *Blood* **82**(10): 2998-3004.
- Hsu HL, Cheng JT, Chen Q and Baer R (1991). "Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins." *Mol Cell Biol* **11**(6): 3037-3042.
- Hsu HL, Wadman I and Baer R (1994). "Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3181-3185.
- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD and Tenen DG (2008). "PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis." *Nat Genet* **40**(1): 51-60.
- Huang PN, Lin JY, Locker N, Kung YA, Hung CT, Lin JY, Huang HI, Li ML and Shih SR (2011). "Far upstream element binding protein 1 binds the internal ribosomal entry site of enterovirus 71 and enhances viral translation and viral growth." *Nucleic Acids Res* **39**(22): 9633-9648.
- Huang S and Brandt SJ (2000a). "mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor." *Mol Cell Biol* **20**(6): 2248-2259.
- Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z and Brandt SJ (2000b). "P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL." *EMBO J* **19**(24): 6792-6803.
- Huang S, Qiu Y, Stein RW and Brandt SJ (1999). "p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein." *Oncogene* **18**(35): 4958-4967.
- Humeniuk R, Rosu-Myles M, Fares J, Koller R, Bies J and Wolff L (2013). "The role of tumor suppressor p15Ink4b in the regulation of hematopoietic progenitor cell fate." *Blood Cancer J* **3**(1): e99.
- Hunter T and Pines J (1994). "Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age." *Cell* **79**(4): 573-582.
- Huth JR, Yu L, Collins I, Mack J, Mendoza R, Isaac B, Braddock DT, Muchmore SW, Comess KM, Fesik SW, Clore GM, Levens D and Hajduk PJ (2004). "NMR-driven discovery of benzoylanthranilic acid inhibitors of far upstream element binding protein binding to the human oncogene c-myc promoter." *J Med Chem* **47**(20): 4851-4857.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M and 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**(3): 299-304.
- Ihle JN (1992). "Interleukin-3 and hematopoiesis." *Chem Immunol* **51**: 65-106.

- Irwin N, Baekelandt V, Goritchenko L and Benowitz LI (1997). "Identification of two proteins that bind to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA." *Nucleic Acids Res* **25**(6): 1281-1288.
- Jacob AG, Singh RK, Mohammad F, Bebee TW and Chandler DS (2014). "The splicing factor FUBP1 is required for the efficient splicing of oncogene MDM2 pre-mRNA." *J Biol Chem* **289**(25): 17350-17364.
- Jang M, Park BC, Kang S, Chi SW, Cho S, Chung SJ, Lee SC, Bae KH and Park SG (2009). "Far upstream element-binding protein-1, a novel caspase substrate, acts as a cross-talker between apoptosis and the c-myc oncogene." *Oncogene* **28**(12): 1529-1536.
- Kassouf MT, Chagraoui H, Vyas P and Porcher C (2008). "Differential use of SCL/TAL-1 DNA-binding domain in developmental hematopoiesis." *Blood* **112**(4): 1056-1067.
- Kassouf MT, Hughes JR, Taylor S, McGowan SJ, Soneji S, Green AL, Vyas P and Porcher C (2010). "Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells." *Genome Res* **20**(8): 1064-1083.
- Kaushansky K (1994). "The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development." *Stem Cells* **12 Suppl 1**: 91-96; discussion 96-97.
- Kaushansky K (1998). "Thrombopoietin." *N Engl J Med* **339**(11): 746-754.
- Kaushansky K (2005a). "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis." *J Clin Invest* **115**(12): 3339-3347.
- Kaushansky K (2005b). "Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell." *Ann N Y Acad Sci* **1044**: 139-141.
- Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS and et al. (1994). "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin." *Nature* **369**(6481): 568-571.
- Kee BL (2009). "E and ID proteins branch out." *Nat Rev Immunol* **9**(3): 175-184.
- Keller JR, Ortiz M and Ruscetti FW (1995). "Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division." *Blood* **86**(5): 1757-1764.
- Kerenyi MA and Orkin SH (2010). "Networking erythropoiesis." *J Exp Med* **207**(12): 2537-2541.
- Kershner E, Wu SY and Chiang CM (1998). "Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes." *J Biol Chem* **273**(51): 34444-34453.
- Kikuchi A, Hayashi Y, Kobayashi S, Hanada R, Moriwaki K, Yamamoto K, Fujimoto J, Kaneko Y and Yamamori S (1993). "Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma." *Leukemia* **7**(7): 933-938.
- Kim HO (2014). "In-vitro stem cell derived red blood cells for transfusion: are we there yet?" *Yonsei Med J* **55**(2): 304-309.
- Kim MJ, Park BJ, Kang YS, Kim HJ, Park JH, Kang JW, Lee SW, Han JM, Lee HW and Kim S (2003). "Downregulation of FUSE-binding protein and c-myc by tRNA synthetase cofactor p38 is required for lung cell differentiation." *Nat Genet* **34**(3): 330-336.
- Kingsley PD, Greenfest-Allen E, Frame JM, Bushnell TP, Malik J, McGrath KE, Stoeckert CJ and Palis J (2013). "Ontogeny of erythroid gene expression." *Blood* **121**(6): e5-e13.
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE and Nerlov C (2006). "Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block." *Nat Immunol* **7**(10): 1048-1056.
- Klener P, Fronkova E, Berkova A, Jakska R, Lhotska H, Forsterova K, Soukup J, Kulvait V, Vargova J, Fiser K, Prukova D, Alam M, Calvin Lenyeletse Maswabi B, Michalova K, Zemanova Z, Jancuskova T, Pekova S and Trnny M (2016). "Mantle cell lymphoma-variant Richter syndrome: Detailed molecular-cytogenetic and backtracking analysis reveals slow evolution of a pre-MCL clone in parallel with CLL over several years." *Int J Cancer* **139**(10): 2252-2260.

- Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle I, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E, Liu C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Efstratiadis A, Taghon T, Michor F, Levine RL and Aifantis I (2011). "A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia." *Nature* **473**(7346): 230-233.
- Knoll W (1928). "Blut und blutbildende Organe menschlicher Embryonen." *Nature* **121**: 417.
- Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, Herglotz J, Backert I, Kohrs N, Buscato E, Wittmann SK, Salinas-Riester G, Bonig H, Karas M, Serve H, Proschak E and Lausen J (2014). "PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation." *Nat Commun* **5**: 3995.
- Koury MJ and Haase VH (2015). "Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy." *Nat Rev Nephrol* **11**(7): 394-410.
- Kowalczyk J and Sandberg AA (1983). "A possible subgroup of ALL with 9p." *Cancer Genet Cytogenet* **9**(4): 383-385.
- Krosi G, He G, Lefrancois M, Charron F, Romeo PH, Jolicoeur P, Kirsch IR, Nemer M and Hoang T (1998). "Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells." *J Exp Med* **188**(3): 439-450.
- Kushwah R, Guezguez B, Lee JB, Hopkins CI and Bhatia M (2014). "Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human." *EMBO Rep* **15**(11): 1128-1138.
- Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kohrs N, Herkt S, Wojcik B, Oellerich T, Corso J, Behrens K, Kumar A, Hussong H, Urlaub H, Koch J, Serve H, Bonig H, Stocking C, Rieger MA and Lausen J (2015). "RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation." *Blood* **125**(23): 3570-3579.
- Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, Haman A, Barakat S, Iscove NN, Sauvageau G and Hoang T (2010). "Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells." *Blood* **115**(4): 792-803.
- Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S and Hoang T (2004). "SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression." *Mol Cell Biol* **24**(4): 1439-1452.
- Laird DJ, von Andrian UH and Wagers AJ (2008). "Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease." *Cell* **132**(4): 612-630.
- Lancrin C, Sroczynska P, Serrano AG, Gandillet A, Ferreras C, Kouskoff V and Lacaud G (2010). "Blood cell generation from the hemangioblast." *J Mol Med (Berl)* **88**(2): 167-172.
- Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V and Lacaud G (2009). "The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage." *Nature* **457**(7231): 892-895.
- Landry JR, Kinston S, Knezevic K, de Bruijn MF, Wilson N, Nottingham WT, Peitz M, Edenhofer F, Pimanda JE, Ottersbach K and Gottgens B (2008). "Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver." *Blood* **111**(6): 3005-3014.
- Langan TJ and Chou RC (2011). "Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation." *Methods Mol Biol* **761**: 75-83.
- Latchman DS (1993). "Transcription factors: an overview." *Int J Exp Pathol* **74**(5): 417-422.
- Lausen J (2013). Contributions of the histone arginine methyltransferase PRMT6 to the epigenetic function of RUNX1.
- Lausen J, Pless O, Leonard F, Kuvardina ON, Koch B and Leutz A (2010). "Targets of the Tal1 transcription factor in erythrocytes: E2 ubiquitin conjugase regulation by Tal1." *J Biol Chem* **285**(8): 5338-5346.
- Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F and Oliver PD (1984). "Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells." *Am J Anat* **170**(3): 261-299.
- Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH and Hoang T (2002). "The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1." *Blood* **100**(7): 2430-2440.

- Lecuyer E and Hoang T (2004). "SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia." *Exp Hematol* **32**(1): 11-24.
- Lee E, Han SY, Choi HS, Chun B, Hwang B and Baek EJ (2015). "Red blood cell generation by three-dimensional aggregate cultivation of late erythroblasts." *Tissue Eng Part A* **21**(3-4): 817-828.
- Levens D (2002). "Disentangling the MYC web." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 5757-5759.
- Li Y, Deng C, Hu X, Patel B, Fu X, Qiu Y, Brand M, Zhao K and Huang S (2012). "Dynamic interaction between TAL1 oncoprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis." *Oncogene* **31**(48): 5007-5018.
- Lindemann A and Mertelsmann R (1993). "Interleukin-3: structure and function." *Cancer Invest* **11**(5): 609-623.
- Litzow MR and Ferrando AA (2015). "How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults." *Blood* **126**(7): 833-841.
- Liu J, He L, Collins I, Ge H, Libutti D, Li J, Egly JM and Levens D (2000). "The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription." *Mol Cell* **5**(2): 331-341.
- Liu J, Kouzine F, Nie Z, Chung HJ, Elisha-Feil Z, Weber A, Zhao K and Levens D (2006). "The FUSE/FBP/FIR/TFIIH system is a molecular machine programming a pulse of c-myc expression." *Embo j* **25**(10): 2119-2130.
- Liu ZH, Hu JL, Liang JZ, Zhou AJ, Li MZ, Yan SM, Zhang X, Gao S, Chen L, Zhong Q and Zeng MS (2015). "Far upstream element-binding protein 1 is a prognostic biomarker and promotes nasopharyngeal carcinoma progression." *Cell Death Dis* **6**: e1920.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Loges S, Fehse B, Brockmann MA, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl M, Schuch G, Ergun S, Fischer U, Zander AR, Hossfeld DK, Fiedler W and Gehling UM (2004). "Identification of the adult human hemangioblast." *Stem Cells Dev* **13**(3): 229-242.
- Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM and et al. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo." *Nature* **369**(6481): 565-568.
- Loken MR, Civin CI, Bigbee WL, Langlois RG and Jensen RH (1987). "Coordinate glycosylation and cell surface expression of glycophorin A during normal human erythropoiesis." *Blood* **70**(6): 1959-1961.
- Lombardero M, Kovacs K and Scheithauer BW (2011). "Erythropoietin: a hormone with multiple functions." *Pathobiology* **78**(1): 41-53.
- Lombardi L, Grignani F, Sternas L, Cechova K, Inghirami G and Dalla-Favera R (1990). "Mechanism of negative feed-back regulation of c-myc gene expression in B-cells and its inactivation in tumor cells." *Curr Top Microbiol Immunol* **166**: 293-301.
- Long MW (1998). "Megakaryocyte differentiation events." *Semin Hematol* **35**(3): 192-199.
- Lourenco G, Embury S, Schrier SL and Kedes LH (1978). "Decreased ribosomal RNA content and in vitro RNA synthesis in purified bone marrow erythroblasts of patients with idiopathic ineffective erythropoiesis and DiGuglielmo disease." *Am J Hematol* **5**(3): 169-182.
- Love PE, Warzecha C and Li L (2014). "Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription." *Trends Genet* **30**(1): 1-9.
- Machlus KR and Italiano JE, Jr. (2013). "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation." *J Cell Biol* **201**(6): 785-796.
- Malz M, Weber A, Singer S, Riehmer V, Bissinger M, Riener MO, Longerich T, Soll C, Vogel A, Angel P, Schirmacher P and Breuhahn K (2009). "Overexpression of far upstream element binding proteins: a mechanism regulating proliferation and migration in liver cancer cells." *Hepatology* **50**(4): 1130-1139.
- Marchesi VT (1977). "Molecular features of glycophorin A: the major sialoglycoprotein of the human erythrocyte membrane." *Biochem Soc Trans* **5**(1): 59.

- Margolin AA, Palomero T, Sumazin P, Califano A, Ferrando AA and Stolovitzky G (2009). "ChIP-on-chip significance analysis reveals large-scale binding and regulation by human transcription factor oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 244-249.
- Massari ME and Murre C (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-440.
- Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D and Lemischka IR (1991). "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." *Cell* **65**(7): 1143-1152.
- McCormack MP, Hall MA, Schoenwaelder SM, Zhao Q, Ellis S, Prentice JA, Clarke AJ, Slater NJ, Salmon JM, Jackson SP, Jane SM and Curtis DJ (2006). "A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis." *Blood* **108**(7): 2248-2256.
- McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP and Palis J (2008). "Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus." *Blood* **111**(4): 2409-2417.
- McGrath KE and Palis J (2005). "Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye." *Exp Hematol* **33**(9): 1021-1028.
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ and Maki RA (1996). "Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities." *Embo j* **15**(20): 5647-5658.
- Medvinsky A and Dzierzak E (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." *Cell* **86**(6): 897-906.
- Meier N, Krpic S, Rodriguez P, Strouboulis J, Monti M, Krijgsveld J, Gering M, Patient R, Hostert A and Grosveld F (2006). "Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development." *Development* **133**(24): 4913-4923.
- Migliaccio AR and Palis J (2011). "Blood in a dish: In vitro synthesis of red blood cells." *Drug Discov Today Dis Mech* **8**(1-2): e3-e8.
- Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T and Nakamura Y (2006). "Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells." *Nat Biotechnol* **24**(10): 1255-1256.
- Mikkola HK, Fujiwara Y, Schlaeger TM, Traver D and Orkin SH (2003). "Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo." *Blood* **101**(2): 508-516.
- Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH and Dieterlen-Lievre F (2005). "Placenta as a site for hematopoietic stem cell development." *Exp Hematol* **33**(9): 1048-1054.
- Miller IJ and Bieker JJ (1993). "A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins." *Mol Cell Biol* **13**(5): 2776-2786.
- Miro J, Laaref AM, Rofidal V, Lagrèfeuille R, Hem S, Thorel D, Mechin D, Mamchaoui K, Mouly V, Claustres M and Tuffery-Giraud S (2015). "FUBP1: a new protagonist in splicing regulation of the DMD gene." *Nucleic Acids Res* **43**(4): 2378-2389.
- Mitchell PJ and Tjian R (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* **245**(4916): 371-378.
- Moore MA and Metcalf D (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." *Br J Haematol* **18**(3): 279-296.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W and Tavitan A (1996). "Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2453-2463.
- Morrish F, Isern N, Sadilek M, Jeffrey M and Hockenbery DM (2009). "c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry." *Oncogene* **28**(27): 2485-2491.
- Morrison SJ and Weissman IL (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." *Immunity* **1**(8): 661-673.
-

- Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F and Dzierzak E (1994). "Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo." *Immunity* **1**(4): 291-301.
- Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR and Stuver MH (1994). "Structure and function of helix-loop-helix proteins." *Biochim Biophys Acta* **1218**(2): 129-135.
- Murre C, McCaw PS and Baltimore D (1989a). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." *Cell* **56**(5): 777-783.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB and et al. (1989b). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence." *Cell* **58**(3): 537-544.
- Nakeff A and Maat B (1974). "Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation." *Blood* **43**(4): 591-595.
- Narlikar GJ, Fan HY and Kingston RE (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* **108**(4): 475-487.
- Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RS and Hayward WS (1982). "Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(24): 7842-7846.
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H and Graf T (2000). "GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription." *Blood* **95**(8): 2543-2551.
- Ney PA (2011). "Normal and disordered reticulocyte maturation." *Curr Opin Hematol* **18**(3): 152-157.
- Nielsen JS and McNagny KM (2009). "CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery." *Microcirculation* **16**(6): 487-496.
- North TE, Stacy T, Matheny CJ, Speck NA and de Bruijn MF (2004). "Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells." *Stem Cells* **22**(2): 158-168.
- Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, Habib N, Yosef N, Chang CY, Shay T, Frampton GM, Drake AC, Leskov I, Nilsson B, Preffer F, Dombkowski D, Evans JW, Liefeld T, Smutko JS, Chen J, Friedman N, Young RA, Golub TR, Regev A and Ebert BL (2011). "Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis." *Cell* **144**(2): 296-309.
- O'Neil J and Look AT (2007). "Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation." *Oncogene* **26**(47): 6838-6849.
- O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C and Kelliher M (2004). "TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB." *Cancer Cell* **5**(6): 587-596.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G and Downing JR (1996). "AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis." *Cell* **84**(2): 321-330.
- Olanich ME, Moss BL, Piwnica-Worms D, Townsend RR and Weber JD (2011). "Identification of FUSE-binding protein 1 as a regulatory mRNA-binding protein that represses nucleophosmin translation." *Oncogene* **30**(1): 77-86.
- Orkin SH (1992). "GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells." *Blood* **80**(3): 575-581.
- Orkin SH (2003). "Priming the hematopoietic pump." *Immunity* **19**(5): 633-634.
- Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A and Rabbitts TH (1995). "Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9585-9589.
- Osada H, Grutz GG, Axelson H, Forster A and Rabbitts TH (1997). "LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1." *Leukemia* **11 Suppl 3**: 307-312.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H and Nakauchi H (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." *Science* **273**(5272): 242-245.



- Ott G (2014). "Impact of MYC on malignant behavior." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2014**(1): 100-106.
- Palis J (2008). "Ontogeny of erythropoiesis." *Curr Opin Hematol* **15**(3): 155-161.
- Palis J (2014). "Primitive and definitive erythropoiesis in mammals." *Front Physiol* **5**: 3.
- Palis J, Chan RJ, Koniski A, Patel R, Starr M and Yoder MC (2001). "Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4528-4533.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C and Keller G (1999). "Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse." *Development* **126**(22): 5073-5084.
- Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A and Ferrando AA (2006a). "NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18261-18266.
- Palomero T, Odom DT, O'Neil J, Ferrando AA, Margolin A, Neuberg DS, Winter SS, Larson RS, Li W, Liu XS, Young RA and Look AT (2006b). "Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **108**(3): 986-992.
- Pang AJ and Reithmeier RA (2009). "Interaction of anion exchanger 1 and glycophorin A in human erythroleukaemic K562 cells." *Biochem J* **421**(3): 345-356.
- Pang CJ, Lemsaddek W, Alhashem YN, Bondzi C, Redmond LC, Ah-Son N, Dumur CI, Archer KJ, Haar JL, Lloyd JA and Trudel M (2012). "Kruppel-like factor 1 (KLF1), KLF2, and Myc control a regulatory network essential for embryonic erythropoiesis." *Mol Cell Biol* **32**(13): 2628-2644.
- Park ST and Sun XH (1998). "The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition." *J Biol Chem* **273**(12): 7030-7037.
- Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC and Weissman IL (2005). "Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates." *J Exp Med* **202**(11): 1599-1611.
- Patel B, Kang Y, Cui K, Litt M, Riberio MS, Deng C, Salz T, Casada S, Fu X, Qiu Y, Zhao K and Huang S (2014). "Aberrant TAL1 activation is mediated by an interchromosomal interaction in human T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **28**(2): 349-361.
- Paulus JM (1975). "Platelet size in man." *Blood* **46**(3): 321-336.
- Pease DC (1956). "An electron microscopic study of red bone marrow." *Blood* **11**(6): 501-526.
- Penn LJ, Brooks MW, Laufer EM and Land H (1990). "Negative autoregulation of c-myc transcription." *Embo j* **9**(4): 1113-1121.
- Perkins AC, Gaensler KM and Orkin SH (1996). "Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12267-12271.
- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH and Costantini F (1991). "Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1." *Nature* **349**(6306): 257-260.
- Pfaffl MW (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV and Fitzgerald LA (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." *Blood* **71**(4): 831-843.
- Porcher C, Liao EC, Fujiwara Y, Zon LI and Orkin SH (1999). "Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding." *Development* **126**(20): 4603-4615.
- Ptashne M and Gann A (1997). "Transcriptional activation by recruitment." *Nature* **386**(6625): 569-577.
- Pui CH, Relling MV and Downing JR (2004). "Acute lymphoblastic leukemia." *N Engl J Med* **350**(15): 1535-1548.

- Rabenhorst U, Beinoraviciute-Kellner R, Brezniceanu ML, Joos S, Devens F, Lichter P, Rieker RJ, Trojan J, Chung HJ, Levens DL and Zornig M (2009). "Overexpression of the far upstream element binding protein 1 in hepatocellular carcinoma is required for tumor growth." *Hepatology* **50**(4): 1121-1129.
- Rabenhorst U, Thalheimer FB, Gerlach K, Kijonka M, Bohm S, Krause DS, Vauti F, Arnold HH, Schroeder T, Schnutgen F, von Melchner H, Rieger MA and Zornig M (2015). "Single-Stranded DNA-Binding Transcriptional Regulator FUBP1 Is Essential for Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal." *Cell Rep* **11**(12): 1847-1855.
- Rane SG and Reddy EP (2002). "JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis." *Oncogene* **21**(21): 3334-3358.
- Reid ME (2009). "MNS blood group system: a review." *Immunohematology* **25**(3): 95-101.
- Rekhtman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T and Skoultschi AI (2003). "PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7460-7474.
- Reya T and Clevers H (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* **434**(7035): 843-850.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R and Weissman IL (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." *Nature* **423**(6938): 409-414.
- Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT and Kanki JP (2005). "Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish." *Dev Cell* **8**(1): 97-108.
- Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC and Mikkola HK (2008). "The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation." *Cell Stem Cell* **2**(3): 252-263.
- Rieger MA and Schroeder T (2012). "Hematopoiesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(12).
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE and Galand P (1991). "Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro." *Am J Pathol* **138**(2): 447-453.
- Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D and Begley CG (1995). "Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7075-7079.
- Robertson SM, Kennedy M, Shannon JM and Keller G (2000). "A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1." *Development* **127**(11): 2447-2459.
- Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, Lauw I, Kaimakis P, Jorna R, Vermeulen M, Kayser M, van der Linden R, Imanirad P, Verstegen M, Nawaz-Yousaf H, Papazian N, Steegers E, Cupedo T and Dzierzak E (2009). "Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development." *Cell Stem Cell* **5**(4): 385-395.
- Rogers H, Wang L, Yu X, Alnaeeli M, Cui K, Zhao K, Bieker JJ, Prchal J, Huang S, Weksler B and Noguchi CT (2012). "T-cell acute leukemia 1 (TAL1) regulation of erythropoietin receptor and association with excessive erythrocytosis." *J Biol Chem* **287**(44): 36720-36731.
- Rojas-Sutterlin S, Lecuyer E and Hoang T (2014). "Kit and Scl regulation of hematopoietic stem cells." *Curr Opin Hematol* **21**(4): 256-264.
- Sambrook J, Maniatis T and Fritsch EF (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Garcia I and Rabbitts TH (1993). "LIM domain proteins in leukaemia and development." *Semin Cancer Biol* **4**(6): 349-358.
- Sanchez G, Aragones L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A and Pinto RM (2004). "Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane." *J Virol* **78**(18): 9807-9813.

- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG and Leutz A (2006). "Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation." *Nat Immunol* **7**(10): 1037-1047.
- Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK and Schwartz LW (2003). "In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression." *Exp Hematol* **31**(9): 760-769.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J and Singh H (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." *Science* **265**(5178): 1573-1577.
- Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, Krishnamoorthy V, Bhasin M, Capobianco AJ and Kelliher MA (2006). "Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc." *Mol Cell Biol* **26**(21): 8022-8031.
- Shemin D and Rittenberg D (1946). "The life span of the human red blood cell." *J Biol Chem* **166**(2): 627-636.
- Sherr CJ and Roberts JM (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." *Genes Dev* **9**(10): 1149-1163.
- Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T and Tanaka N (2003). "Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response." *Genes Dev* **17**(18): 2233-2238.
- Shirakata M, Friedman FK, Wei Q and Paterson BM (1993). "Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues." *Genes Dev* **7**(12a): 2456-2470.
- Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA and Orkin SH (1997). "A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development." *EMBO J* **16**(13): 3965-3973.
- Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ and Miller LH (1994). "Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum." *Science* **264**(5167): 1941-1944.
- Singh N, Phillips RA, Iscove NN and Egan SE (2000). "Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis." *Exp Hematol* **28**(5): 527-534.
- Soler E, Andrieu-Soler C, de Boer E, Bryne JC, Thongjuea S, Stadhouders R, Palstra RJ, Stevens M, Kockx C, van Ijcken W, Hou J, Steinhoff C, Rijkers E, Lenhard B and Grosveld F (2010). "The genome-wide dynamics of the binding of Ldb1 complexes during erythroid differentiation." *Genes Dev* **24**(3): 277-289.
- Sommer A, Bousset K, Kremmer E, Austen M and Luscher B (1998). "Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators." *J Biol Chem* **273**(12): 6632-6642.
- Song SH, Hou C and Dean A (2007). "A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function." *Mol Cell* **28**(5): 810-822.
- Staal FJ, Chhatta A and Mikkers H (2016). "Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis." *Exp Hematol* **44**(6): 451-457.
- Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL and Shreeve MM (1971). "Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(7): 1542-1546.
- Suliman A, Lam A, Datta R and Srivastava RK (2001). "Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways." *Oncogene* **20**(17): 2122-2133.
- Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, Hoshino H, Watanabe M, Harada O, Ohtani H, Fukuda M and Nakayama J (2007). "Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis." *Am J Gastroenterol* **102**(7): 1499-1509.
- Swiers G, Patient R and Loose M (2006). "Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification." *Dev Biol* **294**(2): 525-540.

- Takabatake N, Okamura M, Yokoyama N, Ikehara Y, Akimitsu N, Arimitsu N, Hamamoto H, Sekimizu K, Suzuki H and Igarashi I (2007). "Glycophorin A-knockout mice, which lost sialoglycoproteins from the red blood cell membrane, are resistant to lethal infection of *Babesia rodhaini*." *Vet Parasitol* **148**(2): 93-101.
- Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, Nourbakhsh E, Cloonan N, Grimmond SM, Bailey TL and Perkins AC (2010). "A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells." *Genome Res* **20**(8): 1052-1063.
- Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S and Leder P (1982). "Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(24): 7837-7841.
- Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J and Peault B (2010). "Embryonic origin of human hematopoiesis." *Int J Dev Biol* **54**(6-7): 1061-1065.
- Thiede B, Dimmler C, Siejak F and Rudel T (2001). "Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis." *J Biol Chem* **276**(28): 26044-26050.
- Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A and Aifantis I (2007). "The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia." *J Exp Med* **204**(8): 1825-1835.
- Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC and Harte PJ (2009). "CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing." *Development* **136**(18): 3131-3141.
- Till JE and McCulloch EA (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* **14**: 213-222.
- Till JE, McCulloch EA and Siminovitch L (1964). "A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 29-36.
- Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, de Mesy-Bentley KK, Waugh R and Palis J (2007). "The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis." *Blood* **109**(4): 1433-1441.
- Tober J, McGrath KE and Palis J (2008). "Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myc." *Blood* **111**(5): 2636-2639.
- Tonini GP, Radzioch D, Gronberg A, Clayton M, Blasi E, Benetton G and Varesio L (1987). "Erythroid differentiation and modulation of c-myc expression induced by antineoplastic drugs in the human leukemic cell line K562." *Cancer Res* **47**(17): 4544-4547.
- Tropic T, Deng W, Cheng Y, Zhang Y, Vakoc CR, Gregory GD, Hardison RC and Blobel GA (2009). "SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes." *Blood* **113**(10): 2191-2201.
- Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB and Orkin SH (1998). "Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG." *Genes Dev* **12**(8): 1176-1188.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M and Orkin SH (1997). "FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation." *Cell* **90**(1): 109-119.
- Tuteja N, Rahman K, Tuteja R and Falaschi A (1993). "Human DNA helicase V, a novel DNA unwinding enzyme from HeLa cells." *Nucleic Acids Res* **21**(10): 2323-2329.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J and Ponten F (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." *Science* **347**(6220): 1260419.
- Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, Forster A, Li J, Baer R and Rabbitts TH (1994). "The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8617-8621.

- Valverde R, Edwards L and Regan L (2008). "Structure and function of KH domains." *Febs J* **275**(11): 2712-2726.
- Vindigni A, Ochem A, Triolo G and Falaschi A (2001). "Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein." *Nucleic Acids Res* **29**(5): 1061-1067.
- Vitelli L, Condorelli G, Lulli V, Hoang T, Luchetti L, Croce CM and Peschle C (2000). "A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5330-5342.
- Voronova A and Baltimore D (1990). "Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4722-4726.
- Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH and Shivdasani RA (1999). "Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets." *Blood* **93**(9): 2867-2875.
- Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH and Baer R (1994). "The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain." *Oncogene* **9**(12): 3713-3716.
- Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A and Rabbitts TH (1997). "The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins." *EMBO J* **16**(11): 3145-3157.
- Wall L, deBoer E and Grosveld F (1988). "The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein." *Genes Dev* **2**(9): 1089-1100.
- Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, Pierce BG, Dong X, Kundaje A, Cheng Y, Rando OJ, Birney E, Myers RM, Noble WS, Snyder M and Weng Z (2012a). "Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors." *Genome Res* **22**(9): 1798-1812.
- Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin XY, Greven MC, Kim BH, Moore J, Pierce BG, Dong X, Virgil D, Birney E, Hung JH and Weng Z (2013a). "Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium." *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D171-176.
- Wang YM, Zhou P, Wang LY, Li ZH, Zhang YN and Zhang YX (2012b). "Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells." *PLoS One* **7**(8): e42414.
- Wang Z and Bunting KD (2013b). "STAT5 in hematopoietic stem cell biology and transplantation." *Jakstat* **2**(4): e27159.
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ and Rabbitts TH (1994). "The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development." *Cell* **78**(1): 45-57.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C and Fehse B (2008). "A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis." *Mol Ther* **16**(4): 698-706.
- Weiss MJ and Orkin SH (1995). "GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis." *Exp Hematol* **23**(2): 99-107.
- Wen Q, Goldenson B and Crispino JD (2011). "Normal and malignant megakaryopoiesis." *Expert Rev Mol Med* **13**: e32.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT and Aster JC (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* **306**(5694): 269-271.
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS and Aster JC (2006). "c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma." *Genes Dev* **20**(15): 2096-2109.
- Wenger RH and Hoogewijs D (2010). "Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(6): F1287-1296.
- Wijgerde M, Gribnau J, Trimborn T, Nuez B, Philipsen S, Grosveld F and Fraser P (1996). "The role of EKLF in human beta-globin gene competition." *Genes Dev* **10**(22): 2894-2902.

- Wilkinson AC and Gottgens B (2013). "Transcriptional regulation of haematopoietic stem cells." *Adv Exp Med Biol* **786**: 187-212.
- Williams BY, Hamilton SL and Sarkar HK (2000). "The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain." *FEBS Lett* **470**(2): 207-210.
- Williams DE, Morrissey PJ, Mochizuki DY, de Vries P, Anderson D, Cosman D, Boswell HS, Cooper S, Grabstein KH and Broxmeyer HE (1990). "T-cell growth factor P40 promotes the proliferation of myeloid cell lines and enhances erythroid burst formation by normal murine bone marrow cells in vitro." *Blood* **76**(5): 906-911.
- Wilson NK, Miranda-Saavedra D, Kinston S, Bonadies N, Foster SD, Calero-Nieto F, Dawson MA, Donaldson IJ, Dumon S, Frampton J, Janky R, Sun XH, Teichmann SA, Bannister AJ and Gottgens B (2009). "The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene *Scf/Tal1* during early embryonic hematopoietic development." *Blood* **113**(22): 5456-5465.
- Wodnar-Filipowicz A (2003). "Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow." *News Physiol Sci* **18**: 247-251.
- Worton RG, McCulloch EA and Till JE (1969). "Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal." *J Exp Med* **130**(1): 91-103.
- Wu AM, Till JE, Siminovitch L and McCulloch EA (1968). "Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system." *J Exp Med* **127**(3): 455-464.
- Wu C, Jin X, Tsueng G, Afrasiabi C and Su AI (2016). "BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D313-316.
- Xie X, Chan RJ, Johnson SA, Starr M, McCarthy J, Kapur R and Yoder MC (2003). "Thrombopoietin promotes mixed lineage and megakaryocytic colony-forming cell growth but inhibits primitive and definitive erythropoiesis in cells isolated from early murine yolk sacs." *Blood* **101**(4): 1329-1335.
- Xu L, Glass CK and Rosenfeld MG (1999). "Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function." *Curr Opin Genet Dev* **9**(2): 140-147.
- Xu Z, Huang S, Chang LS, Agulnick AD and Brandt SJ (2003). "Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7585-7599.
- Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M and Jacobsen SE (2005). "Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients." *Blood* **105**(7): 2717-2723.
- Yang L, Zhu JY, Zhang JG, Bao BJ, Guan CQ, Yang XJ, Liu YH, Huang YJ, Ni RZ and Ji LL (2015). "Far upstream element-binding protein 1 (FUBP1) is a potential c-Myc regulator in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its expression promotes ESCC progression." *Tumour Biol*.
- Yang YC (1992). "Human interleukin-9: a new cytokine in hematopoiesis." *Leuk Lymphoma* **8**(6): 441-447.
- Young MT, Beckmann R, Toye AM and Tanner MJ (2000). "Red-cell glycoprotein A-band 3 interactions associated with the movement of band 3 to the cell surface." *Biochem J* **350 Pt 1**: 53-60.
- Young MT and Tanner MJ (2003). "Distinct regions of human glycoprotein A enhance human red cell anion exchanger (band 3; AE1) transport function and surface trafficking." *J Biol Chem* **278**(35): 32954-32961.
- Yu M, Riva L, Xie H, Schindler Y, Moran TB, Cheng Y, Yu D, Hardison R, Weiss MJ, Orkin SH, Bernstein BE, Fraenkel E and Cantor AB (2009). "Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis." *Mol Cell* **36**(4): 682-695.
- Yun WJ, Kim YW, Kang Y, Lee J, Dean A and Kim A (2014). "The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the beta-globin LCR and human gamma-globin genes to activate transcription." *Nucleic Acids Res* **42**(7): 4283-4293.

- Zeigler FC, de Sauvage F, Widmer HR, Keller GA, Donahue C, Schreiber RD, Malloy B, Hass P, Eaton D and Matthews W (1994). "In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells." *Blood* **84**(12): 4045-4052.
- Zeller KI, Zhao X, Lee CW, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV and Wei CL (2006). "Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17834-17839.
- Zhang J and Chen QM (2013). "Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond." *Oncogene* **32**(24): 2907-2916.
- Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG and Sun Z (1999). "Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8705-8710.
- Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, Narravula S, Torbett BE, Orkin SH and Tenen DG (2000). "PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding." *Blood* **96**(8): 2641-2648.
- Zhang Z, Harris D and Pandey VN (2008). "The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus." *J Virol* **82**(12): 5761-5773.
- Zheng W, Shen F, Hu R, Roy B, Yang J, Wang Q, Zhang F, King JC, Sergi C, Liu SM, Cordat E, Tang J, Cao Y, Ali D and Chen XZ (2016). "Far Upstream Element-Binding Protein 1 Binds the 3' Untranslated Region of PKD2 and Suppresses Its Translation." *J Am Soc Nephrol*.
- Zheng Y and Miskimins WK (2011). "Far upstream element binding protein 1 activates translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(11): 1641-1648.
- Zhou W, Chung YJ, Parrilla Castellar ER, Zheng Y, Chung HJ, Bandle R, Liu J, Tessarollo L, Batchelor E, Aplan PD and Levens D (2016). "Far Upstream Element Binding Protein Plays a Crucial Role in Embryonic Development, Hematopoiesis, and Stabilizing Myc Expression Levels." *Am J Pathol* **186**(3): 701-715.
- Zhou Y, Kurukuti S, Saffrey P, Vukovic M, Michie AM, Strogantsev R, West AG and Vetrie D (2013). "Chromatin looping defines expression of TAL1, its flanking genes, and regulation in T-ALL." *Blood* **122**(26): 4199-4209.
- Zhu J and Emerson SG (2002). "Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment." *Oncogene* **21**(21): 3295-3313.
- Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D and Pear WS (2005). "Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies." *Blood* **106**(12): 3898-3906.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Die verschiedenen Populationen von hämatopoetischen Stammzellen unterscheiden sich in ihrem Potential zur Selbsterneuerung und Differenzierung.....	4
Abbildung 2.2: Die embryonale Hämatopoese erfolgt im Embryo an unterschiedlichen Orten. ....	5
Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese. ....	6
Abbildung 2.4: Entwicklung in der erythroiden Linie zur reifen Erythrozyte.....	8
Abbildung 2.5: Entwicklung von Thrombozyten in der megakaryozytären Linie.....	9
Abbildung 2.6: Übersicht über ausgewählte Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarker und Zytokine in der megakaryozytär-erythroiden Entwicklung.....	11
Abbildung 2.7: (A) Struktur von TAL1 und (B) Modell des TAL1-E47-Heterodimers während der DNA-Bindung im Bereich des bHLH-Motives.....	17
Abbildung 2.8: TAL1 kann sowohl als (A) Aktivator als auch als (B) Repressor hämatopoetischer Genexpression fungieren. ....	19
Abbildung 2.9: Modell von TAL1 in der Leukemogenese der akuten lymphatischen T-Zellleukämie (T-ALL). ....	21
Abbildung 2.10: Struktur von FUBP1. ....	25
Abbildung 2.11: Die Rolle von FUBP1 in der Entstehung von Leberkrebs.....	28
Abbildung 2.12: Modell für die Regulation von <i>MYC</i> durch FUSE, FUBP1 und FIR. ....	28
Abbildung 3.1: Expression von FUBP1 und TAL1 in verschiedenen Zelllinien und hämatopoetischen Vorläuferzellen. ....	33
Abbildung 3.2: Expression von Differenzierungsmarkern sowie <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> in erythroid differenzierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen. ....	35
Abbildung 3.3: Expression von Differenzierungsmarkern sowie <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> in megakaryozytär differenzierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen.....	36
Abbildung 3.4: Schematische Übersicht des <i>FUBP1</i> -Promotors und dessen Besetzung mit TAL1 und der RNA-Polymerase II in K562-Zellen.....	38
Abbildung 3.5: Bindung von TAL1 und der RNA-Polymerase II auf dem <i>FUBP1</i> -Promotor in erythroid und megakaryozytär differenzierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen. ....	39
Abbildung 3.6: Aktivität des <i>FUBP1</i> -Promotors in HEK293T- und K562-Zellen.....	41
Abbildung 3.7: Die Überexpression von <i>TAL1</i> in HEK293T-, K562- und CD34 <sup>+</sup> -Zellen induziert die <i>FUBP1</i> -Expression.....	42
Abbildung 3.8: Die Expression von <i>FUBP1</i> ist nach dem <i>knock down</i> von <i>TAL1</i> in hämatopoetischen Vorläuferzellen reprimiert. ....	44



Abbildung 3.9: Nach dem <i>knock down</i> von <i>FUBP1</i> ist die Expression von <i>GYP A</i> in K562-Zellen leicht vermindert.....	45
Abbildung 3.10: Die Expression von <i>GYP A</i> ist nach dem <i>knock down</i> von <i>FUBP1</i> in CD34 <sup>+</sup> -Zellen vermindert.....	48
Abbildung 3.11: Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) bilden nach dem <i>knock down</i> von <i>FUBP1</i> weniger erythroide Kolonien. ....	49
Abbildung 3.12: Modell der Regulation von <i>FUBP1</i> durch <i>TAL1</i> während der erythroiden Differenzierung.....	50
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des <i>MYC</i> -Promotors.....	51
Abbildung 3.14: Die Expression von <i>MYC</i> wird durch die ektopische Expression von <i>TAL1</i> in verschiedenen Zellsystemen induziert. ....	52
Abbildung 3.15: Die Expression von <i>MYC</i> ist nach dem <i>knock down</i> von <i>TAL1</i> reprimiert. ....	53
Abbildung 3.16: Die Expression von <i>MYC</i> während der erythroiden Differenzierung. ....	53
Abbildung 3.17: Expression von <i>TAL1</i> , <i>FUBP1</i> und <i>MYC</i> nach Zellsynchronisation in K562-Zellen. ....	55
Abbildung 3.18: Vereinfachte Übersicht über den <i>MYC</i> -Promotor und dessen Besetzung mit <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> in K562-Zellen.....	57
Abbildung 3.19: <i>FUBP1</i> und <i>TAL1</i> besetzen den <i>MYC</i> -Promotor von K562-Zellen nicht gemeinsam.....	58
Abbildung 3.20: Aktivität des <i>MYC</i> -Promotors und dessen Deletionsmutante in HEK293T- und K562-Zellen.....	60
Abbildung 3.21: Besetzung des <i>MYC</i> -Promotors mit <i>FUBP1</i> , <i>TAL1</i> und der RNA-Polymerase II in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.....	61
Abbildung 3.22: Besetzung des <i>MYC</i> Promotors mit <i>FUBP1</i> , <i>TAL1</i> und der RNA-Polymerase II in erythroid differenzierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen im Bereich der FUSE-Sequenz.....	62
Abbildung 3.23: Modell der Regulation von <i>MYC</i> durch <i>FUBP1</i> während der erythroiden Differenzierung.....	63
Abbildung 4.1: Mögliche <i>FUBP1</i> -Bindestellen auf dem <i>GYP A</i> -Promototor.....	71
Abbildung 4.2: Regulatorisches Netzwerk um die zentralen Transkriptionsfaktoren <i>TAL1</i> , <i>FUBP1</i> und <i>MYC</i> .....	78
Abbildung 5.1: Karte des pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Darmstadt). ....	90
Abbildung 5.2: Karte des SEW Vektor zur Produktion lentiviraler Partikel (Demaison <i>et al.</i> , 2002).....	91
Abbildung 5.3: Karte des LeGO iG2 Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel (Weber <i>et al.</i> , 2008). ....	92

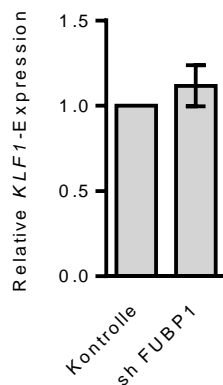
Abbildung 5.4: Karte des pGL4.10 Vektor für die Promotoranalyse (Promega, Madison).....93

Abbildung 9.1: Die Expression von *KLF1* ist nach dem *knock down* von *FUBP1* in CD34<sup>+</sup>-Zellen unverändert. ....127

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht wichtiger Zielgene von TAL1.....	23
Tabelle 2.2: Übersicht über Ziele von FUBP1 als RNA-bindendes Protein.....	26
Tabelle 5.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller.....	80
Tabelle 5.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Hersteller. ....	82
Tabelle 5.3: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien.....	83
Tabelle 5.4: Auflistung der verwendeten FACS Antikörper.....	88
Tabelle 5.5: Auflistung der verwendeten <i>Kits</i> . ....	89
Tabelle 5.6: Auflistung der verwendeten Enzyme. ....	89
Tabelle 5.7: Verwendete Primer zur Sequenzierung des pcDNA3 Vektors. ....	90
Tabelle 5.8: Verwendete Primer zur Sequenzierung des SEW Vektors.....	91
Tabelle 5.9: Verwendete Primer zur Klonierung in den LeGO iG2 Vektor. ....	92
Tabelle 5.10: Verwendete Primer zur Sequenzierung des LeGO iG2 Vektors.....	92
Tabelle 5.13: Verwendete Primer zur Klonierung in den pGL4.10 Vektor.....	93
Tabelle 5.14: Verwendete Primer zur Sequenzierung des pGL4.10 Vektors. ....	93
Tabelle 5.15: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qPCR von cDNA und ChIP-DNA.....	95
Tabelle 5.16: qPCR-Programm für die Messung von cDNA. ....	95
Tabelle 5.17: qPCR-Programm für die Messung von ChIP-DNA.....	95
Tabelle 5.19: Liste der in dieser Arbeit für Western Blot-Analysen (WB) oder zur Immunopräzipitation (IP) verwendeten Primärantikörper.....	98
Tabelle 5.20: Liste der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen (WB) verwendeten mit <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper.....	98
Tabelle 5.21: Liste der in dieser Arbeit in der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) verwendeten Antikörper. ....	100
Tabelle 5.22: Liste der in dieser Arbeit in der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) verwendeten Immunglobuline. ....	100
Tabelle 5.23: Auflistung der Internet-Links zur Proteinatlas-Seite. ....	101
Tabelle 5.24: Auflistung der Internet-Links zur UCSC-Seite.....	102

## 9 Anhang



**Abbildung 9.1: Die Expression von *KLF1* ist nach dem *knock down* von *FUBP1* in  $CD34^+$ -Zellen unverändert.** Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) wurden mit einer gegen *FUBP1* gerichteten shRNA (shFUBP1) transduziert und die transduzierten GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert. Diese Zellen wurden in einem Flüssigmedium kultiviert, welches sowohl erythroide als auch megakaryozytäre Differenzierung zulässt. Die *FUBP1*-Expression wurde durch RT und qPCR an Tag 7 der Differenzierung bestimmt. Als Referenzgen in der qPCR wurde *GAPDH* verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Zellen dreier verschiedener Stammzellspender an.

## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Publikationen

C. Domingo, P. Patel, J. Yillah, M. Weidmann, J. A. Méndez, E. R. Nakouné, M. Niedrig. „Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories“. *J Clin Microbiol* **50**(12): 4054-60.

N. Kohrs, S. Kolodziej, O. N. Kuvardina, J. Herglotz, J. Yillah, S. Herkt, A. Piechatzek, G. Salinas Riestler, T. Lingner, C. Wichmann, H. Bonig, E. Seifried, U. Platzbecker, H. Medyouf, M. Grez, J. Lausen; „MiR144/451 expression is repressed by RUNX1 during megakaryopoiesis and disturbed by RUNX1/ETO“. *PLoS Gen* **12**(3): e1005946.

### 10.2 Posterpräsentationen

J. Yillah, S. Kolodziej, N. Kohrs, J. B. Heidelberger, T. Oellerich, J. Lausen. „Analysis of posttranslational modification crosstalk of the transcription factor Tal1 and the influence of p38 signaling“. UCT Science Day Frankfurt am Main; 2013; Poster Präsentation.

J. Yillah, S. Kolodziej, N. Kohrs, O. N. Kuvardina, J. Herglotz, J. B. Heidelberger, T. Oellerich, J. Lausen. „Regulation of Tal1 by arginine methylation and a potential posttranslational modification crosstalk“. UCT Science Day Frankfurt am Main; 2014; Poster Präsentation.

### 10.3 Patente

J. Büchel, Dr. W. Hofmann, Dr. K. Gundlach, J. Yillah, Dr. S. Steppan. „Magnesium-Liposomen-Komplexe“. Fresenius Medical Care, Renal Pharma; DE102013015334, CN105517538A, WO2015040028A1.

## 11 Lebenslauf

### Zur Person

Name: Mbalia Jasmin Yillah  
 Geburtstag: 28. April 1983  
 Geburtsort: Frankfurt am Main  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Studium und schulische Ausbildung

- 07 / 2013 – 06 / 2016 **Doktorandin**  
 Georg-Speyer-Haus, Institut für Tumorbologie und experimentelle Therapie, Frankfurt am Main  
Titel: *“Die Regulation von FUBP1 durch TAL1 während der Erythropoese”*  
 Betreuer: Dr. J. Lausen und Prof. Dr. M. Zörnig
- 10 / 2010 – 07 / 2012 **Master of Science, Molekular- und Zellbiologie**  
 Freie Universität Berlin  
Titel: *“Charakterisierung der für die Hemmung der adenoviralen Replikation verantwortlichen Elemente im C-Terminus des Rep-Gens des adenoassoziierten Virus Typ II (AAV2)”*  
 Betreuer: Prof. Dr. R. Heilbronn und PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Hauptfächer: Molekulare Virologie, Mikrobiologie, Entwicklungsgenetik
- 04 / 2007 – 09 / 2010 **Bachelor of Science, Biologie**  
 Freie Universität Berlin
- 10 / 2003 – 03 / 2007 **Studium der Publizistik- und Kommunikationswissenschaften**  
 Freie Universität Berlin
- 07 / 2000 - 06 / 2003 **Allgemeine Hochschulreife**  
 Max-Beckmann-Gymnasium, Frankfurt am Main

### Arbeitserfahrung

- 01 / 2013 – 06 / 2013 Fresenius Medical Care, Renal Pharma, Bad Homburg v.d. Höhe, Biomedizinisches Projekt Management, Praktikantin
- 06 / 2010 – 05 / 2011 Robert Koch-Institut, Berlin, Zentrum für Biologische Sicherheit, Nationales Konsiliarlabor für FSME, Prof. Dr. M. Niedrig und Dr. O. Donoso-Mantke, studentische Hilfskraft
- 03 / 2009 – 09 / 2010 Freie Universität Berlin, Institut für Angewandte Genetik, Tutorin
- 03 / 2006 – 12 / 2006 Berliner KommunikationsFORUMs e. V., Mitorganisatorin des “BruttoSozialPreis” 2006

## 12 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Beatrix Süß und Prof. Dr. Alexander Löwer von der TU Darmstadt für die Übernahme des Referates und Koreferates dieser Arbeit, die ich am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen angefertigt habe.

An Dr. Jörn Lausen geht daher mein größter Dank für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen. Außerdem möchte ich ihm für das Engagement und die Energie danken, die er in meine Betreuung investiert hat, sowie für seine Unterstützung, auf die ich mich stets verlassen konnte.

Bei Prof. Dr. Martin Zörnig möchte ich mich neben dem spannenden Thema für die herzliche Aufnahme in sein Labor bedanken, in welchem ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Das ganze wäre ohne Mett Damon nicht halb so angenehm gewesen, daher gilt den Mitgliedern dieser Gruppe auch mehr als ein dickes Dankeschön: Steffi für die gute Laune und das jederzeit offene Ohr in allen Belangen wie z.B. Analytik Jena, Nicole und Horst für ihren fundierten Rat in fachlichen Fragen, Sarah für die Quälerei in den Mittagspausen und den erfolgreichen HM, dieser Sabrina für ihre positive Art, Josi für ebenfalls ganz viel gute Laune und den Ponyhof, Anja für die Luft, Helge für die Einarbeitung und Jenga-Fotos, Vicky für die 90er und die Entdeckung von Obatzda.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der AG Zörnig, die mich super aufgenommen haben, darunter vor allem Susanne für ihre Hilfsbereitschaft, Katha und Steffi für ihren fachlichen Beistand und Marlene für die Weiterführung des Projektes.

Neben den Süßigkeitzuwendungen der AG Wels muss ich auch Torsten für die vielen Bonmots danken, die ich leider nie aufgeschrieben habe.

Herbert danke ich für einen Zwerg, der am Ende immer noch den Schrank bewacht.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mutter, ohne die das alles nie, nie möglich gewesen wäre und auf deren Unterstützung ich mich immer und uneingeschränkt verlassen kann.

Auch Henning gebührt mein Dank, für Frühstück und Auflauf und am meisten fürs Immer-ertragen.

Katja und Elisa muss für die Zerstreuung zwischendurch in Berlin gedankt werden.

Danke natürlich auch an Judith und Boris, ohne die das alles nicht stattgefunden hätte.

Cora hat den Schreibtisch bewacht und für Bewegung zwischendurch gesorgt – Danke.

Und last but not least: Danke Ferrero & Co.! – ohne Schokolade wäre diese Arbeit nicht entstanden!

### **13 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit

„Die Regulation von FUBP1 durch TAL1 während der Erythropoese“

entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den \_\_\_\_\_