



Technische Universität München

Technische Universität München,
TUM School of Medicine and Health

Funktionelle Analyse einer intergenischen Region downstream von *Bcl11b*

Robert Christian Lersch

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Radu Roland Rad
2. Prof. Dr. Dieter Saur
3. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 15.02.2022 bei der Technischen Universität eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 18.07.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	6
2. Tabellenverzeichnis	7
3. Abkürzungsverzeichnis	8
4. Zusammenfassung.....	10
5. Einleitung	12
5.1 T-ALL	12
5.1.1 Klinische Aspekte der T-ALL	12
5.1.2 Histopathologie der humanen T-ALL	14
5.1.3 Genetik der humanen T-ALL	15
5.2 Regulatorische Regionen des Genoms	16
5.2.1 Gene und Genregulierung	16
5.2.2 Enhancer	17
5.2.3 Long non-coding RNAs (lncRNAs)	18
5.3 T-Zellentwicklung	20
5.4 BCL11B	21
5.4.1 BCL11B in der T-Zellentwicklung.....	21
5.4.2 Die Rolle von BCL11B in der T-ALL/T-LBL.....	22
5.5 Mausmodelle in der Krebsforschung.....	23
5.5.1 Genmanipulation in embryonalen Stammzellen mit dem Cre/LoxP-System.....	24
5.5.2 Einfügen von Deletionen im Genom mit dem MICER-System	24
5.5.3 Transposon-Screens in der Maus.....	26
5.6 Ziel der Studie	27
7. Material	28
7.1 Technisches Equipment	28
7.2 Reagenzien und Enzyme	29
7.3 Reagenzien für die Zellkultur	30
7.4 Kommerziell erhältliche Kits	30
7.5 Reagenzien für die Library Präparation und die Sequenzierung.....	31
7.6 Einwegartikel	31
7.7 Bakterienstämme	32
7.8 Plasmide.....	32
7.9 Guide-RNAs	32
7.10 Primersequenzen.....	32
7.11 Zelllinien.....	33
7.12 Antikörper für die Immunhistochemie	33
7.13 MICER-Vektoren	33
7.14 Öffentlich zugängliche Daten	34
7.15 Softwares	34

7.16 Hersteller	35
8. Methoden.....	37
8.1 Tierexperimente.....	37
8.2 Genotypisierung.....	37
8.3 Histologie, H&E-Färbung und Immunhistochemie.....	38
8.4 DNA-Extraktion aus den Maustumoren	39
8.5 Whole-Genome-Sequenzierung (WGS)	39
8.6 RNA-Isolierung	40
8.7 cDNA-Synthese und qPCR.....	40
8.8 RNA-Isolierung aus FFPE-Gewebe	41
8.9 RNA-Sequenzierung.....	42
8.10 CRISPR/Cas9-Knockout eines Enhancers in einer Zelllinie.....	43
9. Ergebnisse	47
9.1 Rezidivierende Insertionen downstream von <i>Bcl11b</i> in einem T-ALL <i>PiggyBac</i> Transposon-Screen in der Maus.....	47
9.2 Strukturelle und funktionelle humane Syntänie der intergenischen Region downstream von <i>BCL11B</i>	49
9.3 Funktionelle Auswirkung der Deletion der intergenischen Region downstream von <i>Bcl11b</i>	50
9.4 Überleben der 105Kb- und 1Mb-KO Mäuse.....	52
9.5 Tumorinzidenz der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse	53
9.6 Tumorspektrum der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse.....	54
9.7 Reduzierte tumorspezifische Überlebensrate von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen	57
9.8 Genetische Aberrationen der T-ALL in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	58
9.9 <i>MYC</i> -Genexpressionssignatur in den T-ALL der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse.....	59
9.10 Fehlende Expression von <i>ThymoD</i> in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen	62
9.11 Strukturelle und funktionelle Analyse eines potentiellen neuen Enhancers von <i>Bcl11b</i>	63
10. Diskussion	68
10.1 <i>Bcl11b</i> -Dosis in der Evolution von hämatologischen Tumoren	68
10.2 Unterschied in der T-ALL-Inzidenz von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen ist unabhängig von <i>ThymoD</i>	69
10.3 Strukturelle und funktionelle Validierung eines unbeschriebenen regulatorischen Elements von <i>Bcl11b</i>	70
10.4 Epigenetische Dysregulation von <i>BCL11B</i> durch rezidivierende Translokationen in der humanen T-ALL	71
10.5 Knockout-Mausmodelle zur funktionellen Charakterisierung von regulatorischen Regionen in Tumoren.....	72
11.7 Fazit und Ausblick.....	74
10. Anhang.....	76

11. Literaturverzeichnis	78
12. Publikationen, die im Rahmen der Doktorarbeit entstanden sind.....	88
13. Preise im Rahmen der Doktorarbeit	88
14. Stipendien im Rahmen der Doktorarbeit	88
15. Danksagung	89

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	MICER-System.....	25
Abbildung 2	Rekurrente Insertionen downstream von <i>Bcl11b</i> in einem Piggy-Bac-T-ALL Mutagenesecscreen.....	48
Abbildung 3	Hohe Konservierung einer intergenischen Region downstream von <i>Bcl11b</i> in T-Zellen.....	49
Abbildung 4	Generierung eines intergenischen 1Mb- und 105Kb-KO downstream von <i>Bcl11b</i> in der Maus.....	50
Abbildung 5	Reduzierte Expression von <i>Bcl11b</i> in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	52
Abbildung 6	Überleben von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	53
Abbildung 7	Tumorinzidenz bei 1Mb- und 105Kb-KO-Mäusen.....	54
Abbildung 8	Tumorspektrum und Histologie von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	56
Abbildung 9	Tumorspezifisches Überleben von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	57
Abbildung 10	Kopienzahlvariation (CNV) in den T-ALL der 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	59
Abbildung 11	Genexpressionsanalysen der T-ALL in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	61
Abbildung 12	Expression der lncRNA <i>ThymoD</i> in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.....	63
Abbildung 13	Identifikation eines unbeschriebenen potentiellen Enhancers in der 1Mb-KO-Region durch epigenetische Marker.....	64
Abbildung 14	CRISPR/Cas9-basierter Knockout des Enhancers in murinen T-Zellen.....	66
Abbildung 15	Solide Tumore in 105Kb- und 1Mb-KO Mäusen.....	76

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chemotherapie der T-ALL bei Kindern.....	13
Tabelle 2	EGIL-Klassifikation der T-ALL/T-LBL.....	15
Tabelle 3	Veränderte Gene in den molekularen Subgruppen der T-ALL.....	16
Tabelle 4	Sequenzierungsmethoden zur Identifikation von Enhancern.....	18
Tabelle 5	Technisches Equipment.....	28
Tabelle 6	Reagenzien und Enzyme.....	29
Tabelle 7	Reagenzien für die Zellkultur.....	30
Tabelle 8	Kommerziell erhältliche Kits.....	30
Tabelle 9	Reagenzien für die Library Präparation und die Sequenzierung.....	31
Tabelle 10	Einwegartikel.....	31
Tabelle 11	Bakterienstämme.....	32
Tabelle 12	Plasmide.....	32
Tabelle 13	Sequenzen der eingesetzten Guide-RNAs.....	32
Tabelle 14	Sequenzen der Primer für die Genotypisierung des intergenischen Knockouts im Zellsystem.....	32
Tabelle 15	Sequenzen der Primer für die Genotypisierung des intergenischen Knockouts in der Maus.....	33
Tabelle 16	Sequenzen der Primer, die für die qPCR verwendet wurden.....	33
Tabelle 17	Zelllinien.....	33
Tabelle 18	Antikörper für die Immunhistochemie.....	33
Tabelle 19	MICER-Vektoren, die für die Generierung der Knockout-Mausmodelle verwendet wurden.....	33
Tabelle 20	Murine öffentlich zugängliche Daten.....	34
Tabelle 21	Humane öffentlich zugängliche Daten.....	34
Tabelle 22	Verwendete Softwares.....	34
Tabelle 23	Hersteller.....	35

3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B-ALL	B-Zell akute lymphatische Leukämie
<i>BCL11B</i>	B-Zell-Lymphom 11B
CAG	CMV, Aktin, Globin
circRNA	Circular RNA
CIS	Common Insertion Site
CNV	Copy Number Variation
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dCas9	Deactivated Cas9
DN	Doppelt Negativ
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
eQTL	Expression Quantitative Trait Locus
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
ETP-ALL	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
FCS	Fetal Calf Serum
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
gRNA	Guide RNA
H3K27ac	Acetylierung des Lysin-27 im Histon 3
H3K4me1	Methylierung des Lysin-4 im Histon 3
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IHC	Immunhistochemie
Indel	Insertion und Deletion
Kb	Kilobasen
KO	Knockout
lncRNA	Long noncoding RNA
Mb	Megabasen
MHPN	Mouse <i>Hprt</i> Plasmid Neo
MHPP	Mouse <i>Hprt</i> Plasmid Puro
MICER	Mutagenic insertion and chromosome engineering resource
Min	Minuten
MSCV	Murine Stem Cell Virus
ncRNA	Noncoding RNA
NGS	Next Generation Sequencing
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	Quantitative PCR
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
T-LBL	T-Zell lymphoblastisches Lymphom
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
TSO	Template Switch Oligo
UMI	Unique Molecular Identifier
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organisation

4. Zusammenfassung

Die T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL) ist eine aggressive Leukämieform bei Kindern und Erwachsenen, die trotz verbesserter Therapieoptionen immer noch mit einer reduzierten Überlebensrate verbunden ist. In bis zu einem Viertel aller T-ALL-Patienten kommt es zu rezidivierenden Translokationen der Gene *TLX3* und *NKX2-5* in eine hochkonservierte intergenische Region downstream von *BCL11B* (Asnafi et al., 2005; Ballerini et al., 2002; Bernard et al., 2001; Przybylski et al., 2006). Bisher wurde angenommen, dass es durch die Aktivierung beider Onkogene durch regulatorische Elemente downstream von *BCL11B* zur Tumorigenese kommt. Den Einfluss dieser Translokationen auf die Expression von *Bcl11b* wurde bisher jedoch nicht genauer untersucht. Daten aus einem *PiggyBac*-Mutagenesecscreen in der Maus unserer Arbeitsgruppe zeigen gehäuft Transposon Insertionen in bestimmten Bereichen dieser Region in der T-ALL. Dies deutet darauf hin, dass die epigenetische Dysregulation von *Bcl11b* durch Inaktivierung der Enhancerelemente eine entscheidende Rolle in der Entstehung der T-Zell-Leukämie spielen könnte.

In dieser Studie wurde die Rolle dieser regulatorischen Region in der Tumorigenese *in vivo* funktionell untersucht. Es wurden zwei am Wellcome Trust Sanger Institute generierte Mausmodelle mit einem 1Mb- (49 Mäuse) und 105Kb- (148 Mäuse) Knockout in der intergenischen Region downstream von *Bcl11b* charakterisiert. Die 105Kb-Deletion überlappt mit der 1Mb-Deletion. Es zeigten sich allel-spezifische Veränderungen der *Bcl11b* Expression im Thymus der Mäuse: bei homozygotem Knockout war *Bcl11b* niedriger exprimiert als bei heterozygotem, und 1Mb-KO Mäuse zeigten eine niedrigere Expression als 105Kb-KO Mäuse. Durch Analysen des Epigenoms und funktionelle Experimente konnte ein *Bcl11b* Enhancer identifiziert werden, der den Unterschied der Expression erklären könnte. Mäuse aus beiden Kohorten entwickelten T-Zell-Leukämien, B-Zell-Lymphome und solide Tumore. Während Tiere mit größerem und homozygotem Knockout eher T-Zell-Leukämien entwickelten, entstanden in heterozygoten Mäusen mit kleinerem Knockout insbesondere solide und B-Zell-Tumore.

Wir beobachten somit eine gewebespezifische Rolle und additive Effekte der regulatorischen Elemente downstream von *Bcl11b*. Allelspezifische Unterschiede hinsichtlich Tumorarten, Latenz und Penetranz spiegeln graduelle Gendysregulationen durch Enhancer-Modularität und Gewebespezifitäten wider. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die rezidivierenden Translokationen der Gene *TLX3* und *NKX2-5* auch durch subtile epigenetische Dysregulation

von *BCL11B* zur Entstehung der humanen T-ALL führen und *BCL11B* als quasi-insuffizientes Tumorsuppressorgen agiert.

5. Einleitung

5.1 T-ALL

5.1.1 Klinische Aspekte der T-ALL

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) unterteilt sich in die akute T- und B-Zell lymphoblastische Leukämie. Die T-ALL umfasst etwa 15% aller ALL bei Kindern und 25% bei Erwachsenen (Ribera et al., 2007).

Klinisch präsentieren sich die Patienten häufig mit Symptomen einer Thrombozytopenie (z.B. Blutung), Blässe, eine Schwellung des Thymus, Müdigkeit durch Anämie oder einer Infektion durch Neutropenie (Hunger and Mullighan, 2015). Die leukämischen Zellen infiltrieren bereits sehr früh das zentrale Nervensystem, sodass viele Patienten bereits zum Zeitpunkt der Erstiagnose Hirnmetastasen haben (Belver and Ferrando, 2016).

Die Diagnostik besteht laut aktuellen Leitlinien aus der Beurteilung der Zellmorphologie im peripheren Blutbild und im Knochenmarkpunktat, der Zytochemie und der Immunzytologie (Baldus and Balabanov, 2020). Hinzu kommen Molekulargenetik und Zytogenetik, zur Differenzierung von Hochrisikosubtypen, sowie die Metastasensuche mittels zytologischer Liquoruntersuchung und CT-Thorax (Baldus and Balabanov, 2020).

5.1.1.1 Therapie bei Kindern

Bei Kindern konnte durch intensivierete Chemotherapie-Regime die Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten auf ungefähr 90% erhöht werden. Die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika bei Kindern sind in Tabelle 1 aufgelistet (Escherich et al., 2016).

Tabelle 1 | Chemotherapie der T-ALL bei Kindern.Chemotherapeutika aus der Leitlinie der Therapie der T-ALL/T-LBL bei Kindern. Aus (Escherich *et al.*, 2016).

Induktionstherapie und Induktionskonsolidierung (9 Wochen)	Prednison oder Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin, Etoposid, Thioguanin
Extrakompartimenttherapie (8 Wochen)	6-Mercaptopurin, Metothrexat
Reinduktionstherapie (7 Wochen)	Dexametason, Asparaginase, Doxorubicin, Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Thioguanin
Erhaltungstherapie (bis 2 Jahre nach Diagnose)	Mercaptopurin, Metothrexat

Bei Kindern besteht die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation bei bestimmten aggressiven genetischen Subtypen, die nicht auf eine molekulare Therapie ansprechen und bei einem Rezidiv mit ungünstigem Risikoprofil (Escherich *et al.*, 2016). Sie ist auch bei erhöhter Blastenzahl im Knochenmark (>5%) nach mehrwöchiger Induktionstherapie sowie einem erhöhten Nachweis einer minimalen Resterkrankung („MRD“, bestimmt durch Polymerase-Kettenreaktion) nach Konsolidierungstherapie gegeben (Escherich *et al.*, 2016). Nach aktuellen Leitlinien ist eine Bestrahlung des ZNS nur bei über 5 Blasten/mm³ im Liquor und bei erhöhtem Rezidiv Risiko indiziert (Escherich *et al.*, 2016).

Durch diese aggressive Polychemotherapie bei Kindern kommt es jedoch zu starken Nebenwirkungen, die sich teilweise erst viele Jahre später manifestieren. Hierzu gehören unter anderem Wachstums- oder Lernstörungen, hormonelle Störungen, Übergewicht, Infertilität, Knochennekrosen, Katarakt und sekundäre Malignome (Ribera *et al.*, 2007). Dies macht es umso wichtiger neue gezieltere Therapieansätze zu entwickeln. So ist bereits eine Behandlung mit gentechnologisch veränderten T-Zellen (CAR-T-Zell-Therapie) bei B-ALL zugelassen worden (Baldus and Balabanov, 2020).

5.1.1.2 Therapie bei Erwachsenen

Bei Erwachsenen ist die Überlebensrate deutlich niedriger als bei Kindern. So war sie noch vor einigen Jahren bei 40%, konnte aber in den letzten Jahren durch Therapieintensivierung etwas erhöht werden (Litzow and Ferrando, 2015).

In der prospektiven Studie CALGB 10403, in der 318 Patienten von 2007 bis 2012 beobachtet wurden, zeigte sich, dass Jugendliche und junge Erwachsene mit T-ALL deutlich von der aktuellen Leitlinientherapie bei Kindern profitieren. In dieser Studie konnte durch das Chemotherapie-Regime das mediane ereignisfreie Überleben von 30 Monaten auf 78,1 Monate bei der untersuchten Altersgruppe verlängert werden (Stock et al., 2019). Es zeigte sich jedoch auch in den Studien GRAALL-2005 und NOPHO ALL 2008 und in einer Studie des Dana-Farber Cancer Institute, dass Erwachsene über 45-55 Jahren nicht von einer intensivierten Therapie wie bei Kindern profitieren, da die Nebenwirkungen deutlich erhöht sind (DeAngelo et al., 2015; Huguet et al., 2018; Toft et al., 2018). Bei älteren Erwachsenen stellt das hyper-CVAD Protokoll deshalb einer der am häufigsten eingesetzten Therapieregime dar (Kantarjian et al., 2004). Es besteht aus der Gabe von hyperfraktioniertem Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason (Kantarjian *et al.*, 2004). In einer Studie aus Schweden zeigte sich allerdings unter dieser Therapie eine erhöhte Rate an Rezidiven (Kozlowski et al., 2014). Erst die Kombination von hyper-CVAD und Nelarabine, ein Prodrug von 9- β -arabinofuranosylguanine, konnte bei Erwachsenen zu einer erhöhten Rate von dauerhaften Remissionen führen (Jain et al., 2014).

Bei Erwachsenen wird wie bei Kindern die intrathekale Chemotherapie-Gabe oder die ZNS-Bestrahlung erst bei Nachweis von Blasten im Liquor empfohlen (Baldus and Balabanov, 2020).

Eine allogene Stammzelltransplantation wird bei refraktären Verläufen und bei Hochrisikogruppen in der ersten Vollremission empfohlen (Baldus and Balabanov, 2020).

5.1.2 Histopathologie der humanen T-ALL

Die akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie kann gemäß der 4. Edition der WHO-Klassifikation für hämatologische Neoplasien in die klassische T-ALL (T-Zell akute lymphoblastische Leukämie) bzw. T-LBL (T-Zell lymphoblastisches Lymphom) und die beiden neuen Entitäten der frühen T-Zell Vorläufer lymphoblastischen Leukämie (ETP-ALL) und der NK-Zell lymphoblastischen Leukämie unterteilt werden (Wenzinger et al., 2018). Bei einer Knochenmarksinfiltration von über 20% handelt es sich um eine T-Zell-Leukämie, während eine hauptsächlich extramedulläre Tumormasse als T-Zell lymphoblastisches Lymphom klassifiziert wird (Wenzinger *et al.*, 2018). Es handelt sich jedoch bei beiden um die gleiche Tumorentität und in der weiteren Arbeit wird die T-ALL/T-LBL daher als T-ALL zusammengefasst (Wenzinger *et al.*, 2018).

Die Blasten bei T-ALL/T-LBL sind bei der Immunophänotypisierung typischerweise positiv für Tdt und CD3 (Wenzinger *et al.*, 2018). Die weitere Subklassifikation nach EGIL in pro-T, prä-T, kortikale und reife T-ALL erfolgt anhand verschiedener Oberflächenmarker (Tabelle 2) (Baldus and Balabanov, 2020).

Tabelle 2 | EGIL-Klassifikation der T-ALL/T-LBL

Immunologische Klassifikation der T-ALL/T-LBL nach bestimmten Oberflächenmarkern. Es wird die pro-T, prä-T, kortikale und reife T-Zell-Leukämie nach der EGIL-Klassifikation unterschieden. Aus (Baldus and Balabanov, 2020).

	Pro-T	Prä-T	Kortikale	Reife
cyCD3	+	+	+/-	-
CD7	+	+	+	+
CD2	-	+	+	+
CD1a	-	-	+	-
mCD3	-	-	+/-	+

Die seit der 4. WHO-Klassifikation neue Entität der ETP-ALL umfasst etwa 10-13% der pädiatrischen T-ALL und 5-10% der adulten T-ALL (Wenzinger *et al.*, 2018). Charakteristisch ist eine Expression von myeloiden und Stammzell-Markern. CD8, CD4 und CD1a werden häufig nicht exprimiert (Haydu and Ferrando, 2013; Wenzinger *et al.*, 2018).

Die NK-ALL/LBL ist durch die Expression von CD56, CD94 und CD161 charakterisiert, wobei sich die Unterscheidung zur T-ALL/T-LBL häufig als sehr schwierig herausstellt (Wenzinger *et al.*, 2018).

5.1.3 Genetik der humanen T-ALL

Die T-ALL entsteht durch eine Kette von genetischen Alterationen, die zur Veränderung von Signalwegen und somit zur ungehemmten Proliferation, Immortalisierung und gestörten Entwicklung von T-Zellen führen (Belver and Ferrando, 2016).

Insbesondere der *NOTCH1*-Signalweg wird durch „Gain-of-function“-Mutationen in bis zu 60% der T-ALL übermäßig aktiviert. Diese Mutationen sind sehr häufig mit Deletionen des *CDKN2A*-Lokus, der für die Tumorsuppressoren p16^{INK4A} und p14^{ARF} kodiert, einhergehend (Belver and Ferrando, 2016). Zudem kommt es durch Translokationen zur verstärkten Expression der onkogenen Transkriptionsfaktoren *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *BHLHB1*, *LMO1*, *LMO2*, *TLX3*, *TLX1*, *NKX2-1*, *NKX2-2*, *NKX2-5*, *HOXA*-Gene, *MYC* und *MYB* (Belver and

Ferrando, 2016). Schließlich sind insbesondere wichtige Entwicklungsgene wie *RUNX1*, *GATA3*, *ETV6* und *BCL11B* häufig mutiert oder deletiert (Belver and Ferrando, 2016).

Genetisch lassen sich auch verschiedene Subtypen der T-ALL unterscheiden. Die ETP-ALL zeigt einen Arrest in den frühesten Stadien der T-Zellentwicklung und die Blasten sind CD4- und CD8-negativ. Diese Unterform weist die genetische Signatur von Stammzell- und myeloiden Genen auf und es kommt deutlich seltener zu Mutationen in *NOTCH1* (Belver and Ferrando, 2016). Bei der zweiten Subgruppe der frühen kortikalen Tumore ($CD1a^+CD4^+CD8^+$) kommt es typischerweise zur Aktivierung von *TLX1*, *TLX3*, *NKX2-1* und *NKX2-2*. Außerdem weist dieser Subtyp die höchste Rate an *NOTCH1*-Mutationen und *CDKN2A*-Deletionen auf (Belver and Ferrando, 2016). Schließlich unterscheidet man eine dritte molekulare Subgruppe, bei der die Thymozyten eine späte kortikale Differenzierung aufweisen ($CD4^+CD8^+CD3^+$). Hier kommt es häufig zur Aktivierung des *TALI*-Onkogens (Belver and Ferrando, 2016). Die molekularen Subgruppen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 | Veränderte Gene in den molekularen Subgruppen der T-ALL

Häufig veränderte Gene in der ETP-, der früh kortikalen und der spät kortikalen T-ALL. ETP, T-Zell Vorläufer lymphoblastische Leukämie. Aus (Belver and Ferrando, 2016).

	Häufig veränderte Gene	Immunophänotyp
ETP	<i>NOTCH1</i> (seltener), <i>CDKN2A</i> (seltener), <i>NRAS</i> , <i>FLT3</i> , <i>ETV6</i> , <i>RUNX1</i> , <i>GATA3</i> , <i>DNMT3A</i> und <i>EZH2</i> , <i>IL7R</i>	$CD4^+CD8^-$
Früh kortikal	<i>NOTCH1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>TLX1</i> oder <i>TLX3</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i> , <i>NUP214-ABL1</i> und <i>PTPN2</i>	$CD1a^+CD4^+CD8^+$
Spät kortikal	<i>NOTCH1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>TALI</i> , <i>LMO1</i> oder <i>LMO2</i> , <i>PTEN</i>	$CD4^+CD8^+CD3^+$

5.2 Regulatorische Regionen des Genoms

5.2.1 Gene und Genregulierung

Nur etwa 1,2% des Genoms kodiert für Proteine und man geht davon aus, dass etwa 80% an der transkriptionellen Regulierung beteiligt sein könnte (Consortium, 2012; Ransohoff et al., 2018). Diese genregulierenden Regionen kann man in cis-regulatorische DNA-Elemente (sogenannte Enhancer und Silencer) und in nicht-kodierende RNA untergliedern (Consortium,

2012; Consortium et al., 2020; Ransohoff *et al.*, 2018; Roadmap Epigenomics et al., 2015; Shlyueva et al., 2014).

Gene und nicht kodierende RNA werden durch die RNA Polymerase II transkribiert. Diese kann das Gen nur binden, wenn das Chromatin offen und nicht in Nukleosomen verpackt ist. (Cramer, 2019). Die Steuerung der zelltypspezifischen oder entwicklungsspezifischen Transkription von Genen erfolgt durch bestimmte Transkriptionsfaktoren, die sowohl die Promotorregion, als auch Enhancer binden können (Cramer, 2019).

Die Interferenz mit regulatorischer DNA führt zu einer subtilen Dysregulation der Genexpression, was als tumorigen beschrieben wurde (Quasi-Insuffizienz) (Alimonti et al., 2010; Berger et al., 2011).

5.2.2 Enhancer

Enhancer bestehen aus verschiedenen kurzen DNA-Motiven, an die bestimmte Transkriptionsfaktoren binden und zusammen mit Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren die Aktivität bestimmen (Shlyueva *et al.*, 2014). Aktive Enhancer werden von Nukleosomen umgeben, die häufig durch die post-transkriptionellen Histonveränderungen H3 Lysin 4 Monomethylierung (H3K4me1) und H3 Lysin 27 Azetylierung (H3K27ac) markiert sind (Shlyueva *et al.*, 2014). Demgegenüber sind inaktive Enhancer in Nukleosom-Komplexe mit H3 Lysin 27 Trimethylierung (H3K27me3) verpackt (Shlyueva *et al.*, 2014). Enhancer die bereit sind aktiviert zu werden (poised enhancer), weisen die Histonmodifikationen H3K4me1 aber nicht H3K27ac auf (Elkon and Agami, 2017). Enhancer agieren unabhängig von der Distanz zu Genen (aus bis zu mehreren Megabasen Entfernung) und können mithilfe von Transkriptionsfaktoren, dem Cohesin-Komplex und anderen Proteinen durch Schleifenbildung die Zielgene aktivieren (Shlyueva *et al.*, 2014). Außerdem sind sie nur in bestimmten Zellen und Entwicklungsstadien aktiv (Long et al., 2016; Shlyueva *et al.*, 2014).

Durch neuere Sequenziertechniken zeigte sich, dass bei den meisten aktiven Enhancern auch nicht-kodierende RNA transkribiert wird. Die Rolle dieser Enhancer RNA (eRNA) ist noch nicht vollständig bekannt. So wird insbesondere diskutiert, ob es sich dabei lediglich um ein Beiprodukt der Transkription handelt oder diese RNA eine spezifische Funktion erfüllt (Li et al., 2016). Dabei könnte die eRNA beispielsweise die Schleifenbildung zwischen Enhancer und Promotor erleichtern (Li *et al.*, 2016).

Sequenzierungsmethoden, die für die Identifikation von Enhancern angewendet werden, sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 | Sequenzierungsmethoden zur Identifikation von Enhancern

Sequenzierungsmethoden für die Identifikation von epigenetischen Markern, die auf cis-regulatorische Elemente und deren Funktion hindeuten. Seq, Sequenzierung; DNase, Desoxyribonuklease; ATAC, Assay for Transposase-Accessible Chromatin; ChIP, Chromatin Immunoprecipitation; GRO, Global Run-On. Aus (Elkon and Agami, 2017).

Method	Beschreibung
DNase-Seq	Identifizierung von offenem Chromatin durch Dnase-Verdau
ATAC-Seq	Identifikation von offenem Chromatin mithilfe der Tn5-Transposase
ChIP-Seq	Identifikation von epigenetischen Veränderungen der Histone und Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren
GRO-Seq	Identifikation von transkribierten Bereichen der DNA, insbesondere hilfreich bei eRNA und somit als Marker für die Enhancer-Aktivität
RNA-Seq	Erkennung von transkribierter nicht kodierender RNA
Chromosome Conformation Capture	Analyse der räumlichen Organisation von Chromatin, Erkennung der Interaktion von Enhancern mit assoziierten Genen

5.2.3 Long non-coding RNAs (lncRNAs)

lncRNAs nehmen eine gewebespezifische Schlüsselrolle in der Genregulierung ein (Statello et al., 2021). Es handelt sich um RNA-Transkripte, die nicht für Proteine kodieren und per definitionem länger als 200 Nukleotide sind (Quinn and Chang, 2016). Damit differenzieren sie sich von mRNA, tRNA, miRNA und snoRNA (Quinn and Chang, 2016). Wie auch Enhancer zeigen lncRNAs eine sehr zell- und kontextspezifische Expression (Derrien et al., 2012).

Es können drei große Gruppen unterschieden werden: (i) lncRNAs, die als Beiprodukt der Transkription entstehen und möglicherweise keine biologische Funktion vermitteln, (ii) lncRNAs, die ihre Funktion sequenzunabhängig erfüllen und (iii) lncRNAs, die ihre Funktion durch eine spezifische Nukleotid-Sequenz ausüben und sowohl in cis als auch in trans (teilweise über mehrere Chromosomen hinweg) agieren (Quinn and Chang, 2016).

LncRNAs können intergenisch (lincRNA), intronisch oder überlappend mit Exons eines Gens liegen (Derrien *et al.*, 2012). Letztere werden als Antisense-RNA definiert, wenn der dem Gen gegenüberliegende DNA-Strang transkribiert wird (Derrien *et al.*, 2012).

Es bestehen jedoch auch Gemeinsamkeiten mit mRNA: (i) beide werden von der RNA-Polymerase II transkribiert, (ii) die post-transkriptionellen epigenetischen Histonveränderungen im Bereich des Promoters sind die gleichen, (iii) beide weisen eine 5'-Cap-Struktur und einen Poly(A)-Schwanz auf und (iv) beide RNA-Formen werden dem Splicing unterzogen. Es gibt allerdings auch viele Ausnahmen. So sind beispielsweise nicht alle lncRNAs polyadenyliert (Derrien *et al.*, 2012; Quinn and Chang, 2016). In anderen Punkten unterscheidet sich die nicht kodierende RNA maßgeblich von der mRNA: (i) sie kodiert nicht für Proteine, (ii) sie ist meist kürzer als mRNA, (iii) sie besteht häufig nur aus 2 Exons, (iv) die Sequenz ist meist geringer zwischen verschiedenen Spezies konserviert und (v) die zelluläre Expression von lncRNAs ist deutlich niedriger (Cabali *et al.*, 2011; Derrien *et al.*, 2012; Quinn and Chang, 2016).

Funktionell interagieren lncRNAs mit DNA, RNA sowie mit Proteinen und regulieren Gene durch die Veränderung der Chromatinstruktur, die Modulierung der Transkription und beeinflussen das Splicing, die Stabilität und die Translation der RNA (Statello *et al.*, 2021). So kann die negative Ladung der RNA die positive Ladung der Histonschwänze neutralisieren und das Chromatin auflockern (Statello *et al.*, 2021). Die Interaktion mit Proteinen schließt insbesondere zell- und entwicklungspezifische Transkriptionsfaktoren, Proteine, die Chromatin-Interaktionen regulieren (*CTCF*), sowie Modulatoren der Chromatinstruktur (*PRC2*) mit ein (Statello *et al.*, 2021). Die direkte Interaktion der lncRNA mit DNA kann zur Bildung von R-Loops und von Dreifach-Helices führen und so Gene aktivieren und inaktivieren (Statello *et al.*, 2021). Die posttranskriptionale Regulierung können lncRNAs beispielsweise durch die direkte Bindung von mRNA beeinflussen und so unter anderem das Splicing der RNA modulieren (Statello *et al.*, 2021). Sequenzunspezifisch können lncRNAs durch die reine Transkription bestimmte Chromatinzustände an dem Locus herbeiführen oder Gene durch die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie inaktivieren (Latos *et al.*, 2012; Statello *et al.*, 2021).

Die Deregulierung von lncRNAs wurde in vielen verschiedenen Tumorarten beschrieben (Huarte, 2015; Ransohoff *et al.*, 2018; Schmitt and Chang, 2016).

5.3 T-Zellentwicklung

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoietischen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in die Thymusrinde einwandern (Rothenberg, 2019). Anfangs durchlaufen diese folgende CD4- und CD8-negativen Pro T-Zell-Stadien: ETP bzw. DN1 (Kit⁺CD25⁻CD44⁺), DN2a (Kit⁺⁺CD25⁺CD44⁺), DN2b (Kit⁺CD25⁺CD44⁺), DN3a (Kit⁻CD25⁺CD44⁻), DN3b (Kit⁻CD25⁺CD44⁻CD28⁺) und DN4 (Kit⁻CD25⁻CD44⁻CD28⁺) (Rothenberg, 2019). Der T-Zell Rezeptor (TCR) bildet sich auf der Oberfläche der Zellen in zwei Schritten: die TCR- β Umlagerung findet im DN3a-Stadium und die TCR- α Umlagerung im Stadium der doppelt positiven T-Zellen statt (Rothenberg, 2019).

Die frühe T-Zellentwicklung wird anfangs insbesondere durch den Notch-Signalweg eingeleitet. Notch1, das auf der Oberfläche der multipotenten hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimiert wird, interagiert mit dem Delta-Ligand auf der Oberfläche der Stromazellen der Thymusrinde und die frühe Entwicklung beginnt (Takahama, 2006; Takahama et al., 2017). Dies wird außerdem durch das Zytokin IL-7, das Chemokin CXCL12 und den Kit-Liganden, die ebenfalls von den Stromazellen exprimiert werden, unterstützt (Calderon and Boehm, 2012; Rothenberg, 2019; Takahama *et al.*, 2017; Zamisch et al., 2005). Durch den Notch-Signalweg wird daraufhin eine Kaskade an Transkriptionsfaktoren mobilisiert. GATA-3, TCF-1, HES1 und NFAT führen zur Transition der Vorläuferzellen in das DN2a Stadium (Shah and Zuniga-Pflucker, 2014). Der Transkriptionsfaktor BCL11B, der durch NOTCH1, TCF1, GATA-3 und RUNX1 aktiviert wird, leitet daraufhin das DN2b-Stadium der T-Zelllinie ein. Ab diesem Moment ist eine Differenzierung in andere hämatopoietische Zellreihen nicht mehr möglich (Hosokawa et al., 2020; Kueh et al., 2016; Rothenberg, 2019). Schließlich regulieren BCL11B, GATA-3 und TCF-1 die weitere Entwicklung zu den Stadien der CD4- und CD8-positiven T-Zellen (Rothenberg, 2019; Shah and Zuniga-Pflucker, 2014).

Die doppelt positiven T-Zellen werden weiter im Thymusmark selektiert und differenzieren sich mithilfe der Transkriptionsfaktoren ThPOK, TOX und GATA-3 zu CD4⁺-T-Zellen und durch *RUNX3* zu CD8⁺-T-Zellen (Shah and Zuniga-Pflucker, 2014; Takahama *et al.*, 2017).

Die Entwicklung von T-Zellen ist bei den Wirbeltieren sehr stark konserviert. Deshalb sind Mausmodelle ein viel verwendetes und geeignetes Medium, um diesen Prozess besser erforschen zu können (Litman et al., 2010; Rothenberg, 2019). Hier hat sich insbesondere das OP9-DL1-System etabliert, bei dem hämatopoietische Stammzellen aus der Maus zusammen

mit OP9-Stromazellen, die den Delta-Liganden 1 exprimieren, kokultiviert werden (Lehar and Bevan, 2002).

5.4 *BCL11B*

Der Transkriptionsfaktor BCL11B (B-Zell-Lymphom 11B), auch genannt CTIP2 (COUP TF-interacting protein 1) oder RIT1, wurde nach dem stark homologen Transkriptionsfaktor BCL11A, der in B-Zell-Lymphomen beschrieben wurde, benannt (Satterwhite et al., 2001). Das Protein besteht aus 813 Aminosäuren und agiert mit seinen 6 Zinkfingerdomänen als transkriptioneller Repressor (Avram et al., 2000).

Neben seiner Funktion in der T-Zellentwicklung, spielt *BCL11B* eine große Rolle in der Entwicklung des Gehirns. Kinder mit Mutationen in diesem Gen zeigen neurologische Entwicklungsstörungen (Arlotta et al., 2005; Lessel et al., 2018).

5.4.1 *BCL11B* in der T-Zellentwicklung

Die wesentliche Rolle von *Bcl11b* in der T-Zellentwicklung wurde erstmals in Mäusen beobachtet, bei denen die hämatopoietischen Zellen nach homozygoter Deletion des Gens nicht mehr das doppelt positive Stadium (CD4⁺CD8⁺) erreichen konnten (Wakabayashi et al., 2003b). In dieser Studie sind *Bcl11b*^{-/-} Mäuse bereits in den ersten Tagen nach Geburt gestorben. Fetale Leberzellen dieser Tiere, die normalerweise in alle hämatopoietischen Zellreihen differenziert werden können, wurden daraufhin in immundefiziente Mäuse transplantiert (Gudmundsson et al., 2012; Wakabayashi et al., 2003b). Hier zeigte sich, dass diese *Bcl11b*^{-/-}-Zellen sich nicht zu T-Zellen differenzieren konnten und der T-Zellrezeptor sich nicht mehr ausbildete. Bei heterozygot deletiertem *Bcl11b* wiesen die Mäuse keinen eindeutigen Phänotyp auf (Wakabayashi et al., 2003b).

In einem *in vitro* Differenzierungssystem (OP9-DL1) konnte gezeigt werden, dass in der Maus die Deletion von *Bcl11b* die Differenzierung von T-Zellen vom DN2- in das DN3-Stadium verhindert (Ikawa et al., 2010; Li et al., 2010a; Li et al., 2010b). Außerdem ist während des DN1- und DN2-Entwicklungsstadiums *Bcl11b* stark hochreguliert (Li et al., 2010b). *Bcl11b* agiert für diese Funktion als starker Repressor von bestimmten Genen: (i) das in den frühen Stadien der T-Zellentwicklung aktive *Kit* und (ii) *Id2*, *Zbtb16* und *Nfil3*, die in natürlichen Killerzellen und in „innate lymphoid cells“ (ILC) aktiv sind (Li et al., 2010b; Longabaugh et al., 2017). Warum letztere bereits inaktive Gene reprimiert werden, könnte sich dadurch

erklären, dass diese Gene in früheren Stadien der T-Zellentwicklung von dem Transkriptionsfaktor *Pu.1*, der später herunterreguliert wird, gebunden werden und *Bcl11b* den Platz von *Pu.1* übernimmt (Longabaugh *et al.*, 2017). *Bcl11b*-deletierte T-Zellen verlieren somit nicht ihr myeloides und NK-Zell-Potential (Ikawa *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010b).

Bcl11b selbst wird insbesondere durch das Zusammenspiel des *Notch*-Signalweges, *Tcf1* und *Gata3* aktiviert und *Runx1* ist für die verstärkte Aktivierung im DN2a- und DN2b-Stadium verantwortlich (Kueh *et al.*, 2016; Rothenberg, 2019).

Im Menschen hat *BCL11B* dieselbe Rolle in den frühen T-Zellentwicklungsstufen (Ha *et al.*, 2017). Obwohl der Transkriptionsfaktor auch hier als Repressor von Genen der NK- und myeloiden Zellreihe agiert, kommt es, im Kontrast zur Maus, zusätzlich zur Aktivierung von spezifischen Genen der T-Zell-Linie (Ha *et al.*, 2017).

5.4.2 Die Rolle von *BCL11B* in der T-ALL/T-LBL

Bei einem strahlungsinduzierten Mutagenesecscreen in der Maus, wurde *BCL11B* zum ersten Mal in Zusammenhang mit der T-ALL/T-LBL gebracht: bei 62% der T-Zell-Neoplasien zeigte sich eine Deletion eines Abschnitts von Chromosom 12, auf dem das Gen *BCL11B* liegt (Shinbo *et al.*, 1999). Bei einer darauffolgenden Studie wurden ebenfalls rezidivierende Deletionen dieses Gens bei strahlungsinduzierten Thymuslymphomen beobachtet, welche in Zusammenhang mit Veränderungen des Tumorsuppressorgens *P53* standen (Wakabayashi *et al.*, 2003a).

Spätere Sequenzierstudien von T-ALL-Patienten zeigten, dass etwa 10% der Tumore eine Mutation oder Deletion in *BCL11B* tragen, die zur Inaktivierung des Gens führen (Belver and Ferrando, 2016; Gutierrez *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Interessanterweise fungiert das Gen hierbei als haploinsuffizienter Tumorsuppressor und ist jeweils nur auf einem Allel inaktiviert (Gutierrez *et al.*, 2011; Pinkney *et al.*, 2015). Insbesondere die molekulare Subgruppe der ETP-ALL, die mit einer schlechten Prognose verbunden ist, zeigt eine sehr niedrige Expression von *BCL11B* (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2017; Treanor *et al.*, 2014).

In anderen Studien wurde jedoch auch gezeigt, dass *BCL11B* bei einigen Patienten mit T-Zellleukämie überexprimiert ist (He *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2010). Dies könnte möglicherweise durch einen anti-apoptotischen Effekt des Proteins bedingt sein (Huang *et al.*, 2010).

Demnach spielt *BCL11B* eine sehr zellspezifische und dosisabhängige Rolle in der Tumorigenese, die funktionell noch weitgehend unbeschrieben ist.

5.4.3 Intergenische Region downstream von *BCL11B*

Downstream von *BCL11B* befindet sich sowohl beim Menschen auf Chromosom 14, als auch in der Maus auf Chromosom 12 eine über 1 Megabase große intergenische Region, die regulatorische Elemente von *BCL11B* enthält (Isoda et al., 2017b; Li et al., 2013).

Etwa 850 Kb downstream von *Bcl11b* wurde in der Maus ein Super-Enhancer (*Major Peak*) beschrieben (Li et al., 2013). Epigenetische Analysen von Histonveränderungen, Hi-C- und ChIP-Seq-Daten von GATA3, Pu.1, Tcf1 und Runx1 deuteten darauf hin, dass dieser Super-Enhancer *Bcl11b* reguliert und eine wichtige Rolle in der T-Zellentwicklung spielt (Li et al., 2013). Neben diesem Super-Enhancer wurde außerdem die nicht kodierende RNA *ThymoD* entdeckt, die zur Chromatinschleifenbildung zwischen dem Enhancer und dem Promotor von *Bcl11b* führt (Isoda et al., 2017b). Funktionell interagiert *ThymoD* mit Cohesin und unterstützt die Demethylierung CTCF-gebundener DNA (Isoda et al., 2017b).

In 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-ALL kommt es zu einer Translokation von *TLX3* in den intergenischen Bereich downstream von *BCL11B* (Asnafi et al., 2005; Ballerini et al., 2002; Bernard et al., 2001). Seltener ist auch das Gen *NKX2-5* betroffen (Przybylski et al., 2006). Bisher wurde gezeigt, dass die Überexpression beider Gene durch die regulatorischen Elemente vor *BCL11B* zur Tumorigenese beiträgt (Belver and Ferrando, 2016). Ob die zusätzliche Dyregulation von *BCL11B* durch die Interferenz mit der regulatorischen Region auch zur Entstehung von T-ALL beiträgt, wurde bisher nicht untersucht.

5.5 Mausmodelle in der Krebsforschung

Da Mausmodelle es ermöglichen organismale Phänotypen zu untersuchen, haben sie biologische Forschung revolutioniert (van der Weyden et al., 2002). So ist das Genom zwischen Maus und Mensch stark konserviert: etwa 40% der menschlichen DNA hat einen homologen Locus in der Maus (Kwon and Ernst, 2021; Schwartz et al., 2003). Zudem wurde das Genom von Mäusen sowohl auf genomischer als auch auf epigenetischer Ebene bereits detailliert charakterisiert (Consortium, 2012; Consortium et al., 2020; Frese and Tuveson, 2007). Während früher vor allem Xenograftmodelle und Mutagenesescrines, bei denen Mäuse Strahlung, Chemikalien und pathogenen Viren ausgesetzt waren, eingesetzt wurden (Frese and Tuveson, 2007), sind heutzutage gentechnisch veränderte Mäuse und genomweite Screening-Ansätze mit CRISPR/Cas- und Transposonttechnologien ein häufig verwendetes Modell für die Erforschung der Tumorigenese (Weber et al., 2020).

5.5.1 Genmanipulation in embryonalen Stammzellen mit dem Cre/LoxP-System

Das Cre/LoxP-System wurde ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 isoliert und für die Genmanipulation in eukaryotischen Zellen adaptiert (Sternberg and Hamilton, 1981; Yu and Bradley, 2001). Mit diesem System können durch Manipulation von embryonalen Stammzellen gezielt Veränderungen im Genom von Mäusen eingefügt werden (Yu and Bradley, 2001). Mithilfe eines Zielvektors mit einer homologen Sequenz wird eine loxP-Stelle an einen definierten Ort im Genom der Maus gebracht. Die loxP-Sequenz besteht aus zwei 13 Basenpaar großen umgekehrten Wiederholungsnukleotidsequenzen und einer 8 Basenpaar großen Spacer-Region im Zentrum (Yu and Bradley, 2001). Stammzellen, die die loxP-Sequenz tragen, können mithilfe eines Markergens, das auf dem Zielvektor liegt, selektiert werden (Yu and Bradley, 2001). Eine weitere loxP-Sequenz kann an einem anderen Ort auf demselben oder einem anderen Chromosom auf die gleiche Weise eingefügt werden (Yu and Bradley, 2001). Durch anschließende Behandlung mit einer Cre-Rekombinase wird das Genom editiert: bei gleicher Orientierung der loxP-Sequenzen rekombinieren beide und es entsteht eine Deletion. Bei entgegengesetzter Orientierung kommt es zur Inversion (Adams et al., 2004; Yu and Bradley, 2001). Auch Duplikationen und Translokationen können eingefügt werden (Yu and Bradley, 2001). Die embryonalen Stammzellen, die die gewünschte genetische Veränderung tragen, werden dann in eine Blastozyste injiziert. Diese wird daraufhin einer scheinsschwangeren Maus implantiert und schließlich entstehen durch gezielte Zuchtschemata transgene Mäuse (Yu and Bradley, 2001).

5.5.2 Einfügen von Deletionen im Genom mit dem MICER-System

MICER („Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource“) ist eine öffentlich zugängliche Ressource von Zielvektoren, die für die Manipulation von Chromosomen in der Maus verwendet werden können (Adams *et al.*, 2004). Mit dieser Vektorlibrary können etwa 11% der Gene in der Maus mithilfe des Cre/LoxP-Systems editiert werden (Adams *et al.*, 2004). Im Durchschnitt sind die Zielvektoren etwa 7 Kilobasen groß und tragen eine Kilobasen große homologe Sequenz zur Region im Genom, die gentechnisch verändert werden soll (Adams *et al.*, 2004). Daneben enthalten die Zielvektoren jeweils eine loxP-Sequenz (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Der 5'-Vektor (5'-Hprt oder MHPN) trägt zusätzlich das Exon 1-2 des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (*HPRT*), eine Neomycin-Resistenz und das Fellfarbmarkergen Tyrosinase (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Der 3'-Vektor (3'-Hprt oder MHPP) enthält zusätzlich das Exon 3-9 des *HPRT*-Gens, eine Puromycin-

Resistenz und das Fellfarbmarkergen Agouti (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Die beiden Vektoren werden durch Elektroporation in die embryonischen Stammzellen eingebracht (Yu and Bradley, 2001). Durch Insertions-Targeting integrieren die Vektoren in die gewünschte Region des Genoms: die homologe Sequenz beider Zielvektoren trägt eine Lücke, die durch Vorlage der genomischen DNA repariert wird und so kommt es zur Duplikation der Zielsequenz und Integration der Vektoren in das Genom (Yu and Bradley, 2001). Wie oben beschrieben können durch die gleiche Orientierung der beiden Vektoren und somit der loxP-Sequenzen Deletionen eingeführt werden: durch Expression eines Cre-Enzyms kommt es zur Rekombination der loxP-Sequenzen des MHPN- und MHPP-Vektors und die genomische Sequenz zwischen beiden Vektoren wird deletiert (Yu and Bradley, 2001) (Abb. 1). Zusätzlich kommt es auch zur Rekombination des *HPRT*-Gens, das eine Resistenz gegen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin vermittelt (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Durch diese Resistenz können embryonale Mausstammzellen, die diese Deletion tragen, mit Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium selektiert werden (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Nach Injektion der gentechnisch-veränderten Stammzellen in eine Blastozyste kann eine transgene Mauslinie, die anhand der Fellmarkergene Tyrosinase und Agouti genotypisiert werden kann, generiert werden (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001).

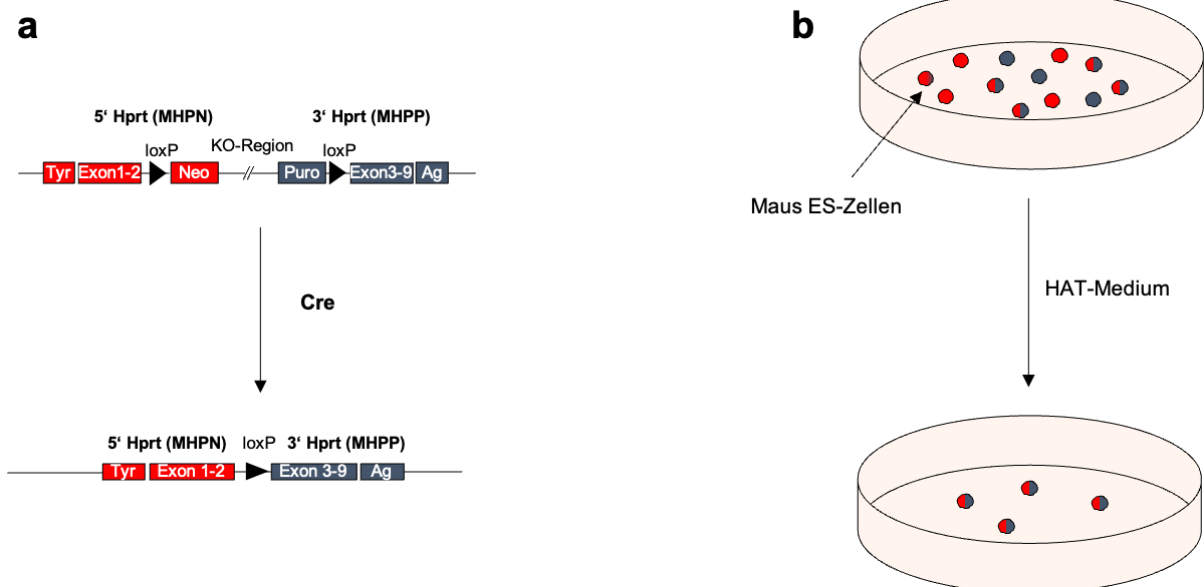


Abbildung 1 | MICER-System.

a, Der 5'-Vektor (5'-Hprt oder MHPN) trägt eine homologe Sequenz zur Zielsequenz, das Exon 1-2 des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (*HPRT*), eine Neomycin-Resistenz und das Fellfarbmarker Gen Tyrosinase (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Der 3'-Vektor (3'-Hprt oder MHPP) enthält eine homologe Sequenz zur Zielsequenz, das Exon 3-9 des *HPRT*-Gens, eine Puromycin-Resistenz und das Fellfarbmarker Gen Agouti (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Nach Expression eines Cre-Enzyms rekombinieren beide Vektoren und das *HPRT*-Gen und es kommt zur Deletion der Zielsequenz (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). Hprt, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; KO-Region, Knockout-Region; Puro, Puromycin-Resistenz; Neo, Neomycin-Resistenz; Tyr, Tyrosinase; Ag, Agouti. **b**, Durch die Expression des *HPRT*-Gens können embryonale Stammzellen, die die erwünschte Deletion tragen, mit HAT-Medium selektiert werden (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001). ES-Zellen, embryonale Stammzellen; HAT-Medium, Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium
a-b, Die gesamte Abbildung wurde aus (Adams *et al.*, 2004) abgeändert.

5.5.3 Transposon-Screens in der Maus

Transposons sind genetische Elemente, die mithilfe einer Transposase an jeden beliebigen Ort im Genom mobilisiert werden können (Dupuy *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2017; Rad *et al.*, 2010). Während Klasse I Transposons durch reverse Transkription als RNA-Zwischenprodukt kopiert und an einer anderen Stelle im Genom wieder eingefügt werden, können Klasse II Transposons durch eine Transposase aus der DNA herausgetrennt und woanders im Genom wieder eingefügt werden (Dupuy *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2017; Rad *et al.*, 2010). Transposons sind in höheren Organismen schon seit Millionen von Jahren inaktiv und erst Klasse II Transposon-Technologien wie *PiggyBac* und *SleepingBeauty* konnten im Säugetiergenom für Insertionsmutagenese in der Maus eingesetzt werden (Dupuy *et al.*, 2005; Rad *et al.*, 2010). Durch Kreuzen einer Transposon tragenden mit einer Transposase exprimierenden Mauslinie, kann das Transposon im Genom der Maus mobilisiert werden (Dupuy *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2017; Rad *et al.*, 2010). Je nach Orientierung und Mobilisierungsort im Genom werden Gene durch den im Transposon enthaltenen Promotor aktiviert oder durch Gen-Trapping mithilfe eines Spleiß-Acceptors und eines Polyadenylierungssignals inaktiviert (Dupuy *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2017; Rad *et al.*, 2010). Durch eine quantitative Sequenziermethode (QiSeq) der in der Maus entstandenen Tumore kann daraufhin nachverfolgt werden, wohin im Tumorgenom das Transposon mobilisiert wurde (Friedrich *et al.*, 2017). Eine Anhäufung von Transposon-Insertionen in einem bestimmten Bereich des Genoms, die statistisch nicht durch Zufall erklärbar ist („Common Insertion Site“, CIS), weist auf ein Krebskandidatengenes in dieser Region hin (de la Rosa *et al.*, 2017; Friedrich *et al.*, 2017; Rad *et al.*, 2010; Rad *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2019).

5.6 Ziel der Studie

Die T-ALL ist trotz verbesserter Therapieoptionen in den letzten Jahren immer noch mit einer niedrigen Überlebensrate einhergehend (Escherich *et al.*, 2016; Litzow and Ferrando, 2015). Um die Erkrankung besser zu verstehen sind genomweite Screenings-Ansätze notwendig. Da Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zeigen, dass ein Großteil aller Krebsrisikovarianten (SNPs) in Tumoren im nicht-kodierenden Bereich des Genoms liegen (Freedman *et al.*, 2011; Nishizaki and Boyle, 2017), ist – zusätzlich zum protein-kodierenden Genom- auch das Regulom und dessen Auswirkungen auf die Tumorigenese interessant. Nicht nur mutierte, sondern auch dyregulierte Gene, die durch eine Veränderung der regulatorischen Landschaft nur minimal von ihrem normalen Expressionslevel abweichen, können für die Tumorigenese entscheidend sein (Alimonti *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2011). Bisher mangelte es allerdings an Screeningansätzen, die auch das Regulom und die daraus resultierende subtile Dysregulation in einem genomweiten Ansatz *in vivo* untersuchen können.

Wir haben dieses Problem adressiert und mithilfe eines genomweiten PiggyBac-Transposonscreens in der Maus das regulatorische Genom der T-ALL studiert (Fischer *et al.*, 2023). Hier fiel insbesondere eine intergenische Region downstream von *Bcl11b* auf. Humane T-ALL-Sequenzierstudien zeigten, dass rezidivierende Translokationen des Onkogens *TLX3* an diesen Locus bei 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-ALL vorhanden sind (Bernard *et al.*, 2001). Es ist bisher noch weitgehend unbekannt, welche funktionelle Auswirkung diese Translokation auf die wahrscheinlich subtile Dyregulation von *BCL11B* hat und welche Rolle diese regulatorischen Elemente in der Tumorigenese spielen (Li *et al.*, 2013). Ziel dieser Studie ist die Untersuchung: (i) der Rolle dieser regulatorischen Region in der T-ALL, (ii) des Einflusses des Locus auf die *Bcl11b*-Expression, (iii) der Auswirkung der Zygote und Größe des Knockouts auf Tumorspektrum und Penetranz sowie (iv) der Genetik der entstandenen Tumore. Damit soll untersucht werden, ob die rezidivierenden Translokationen in diesen intergenischen Locus auch durch epigenetische Dysregulation des quasi-insuffizienten Tumorsuppressorgens *BCL11B* als Treiber der T-ALL fungieren.

7. Material

7.1 Technisches Equipment

Tabelle 5 | Technisches Equipment

Gerät	Hersteller
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Analytical Waage A 120 S	Sartorius AG
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe B.V.
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG
Bad für schwimmendes Paraffingewebe SB80	Thermo Fisher Scientific Inc.
BD FACS Aria™ III Zellsortierer	BD
Beheiztes Paraffineinbettungsmodul EG1150 H	Leica Microsystems GmbH
CytoFLEX LX Flow Durchflusszytometer	Beckman Coulter Life Sciences
DynaMag™-96 Magnetplatte	Thermo Fisher Scientific
Gewebeeinbettautomat ASP300	Leica Microsystems GmbH
Glasware, Schott Duran®	Schott AG
Homogenisator Precellys® 24	Bertin Instruments
Horizontale Gelelektrophoresekammer	Biozym Scientific GmbH
Inkubator NCU-Line® IL 23	VWR International
Magnetrührer D-6010	NeoLab
Maxwell® RSC 48	Promega
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG
Mikrotom Microm HM355S	Siemens AG
Mikrowelle	Thermo Fisher Scientific Inc.
Neubauer Hemozytometer	LO-Laboroptik GmbH
NextSeq 550 Sequenzierautomat	Illumina
Nucleofector™ 2b Gerät	Lonza
pH-Meter 521	WTW GmbH
Pipetten Reference®, Research®	Eppendorf AG
Primovert Mikroskop	Primovert Microscope
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank Klasse II	Thermo Fisher Scientific
StepOne Plus Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems
Thermocycler Tpersonal 48	Biometra
Thermocycler Tprofessional Basic 96	Biometra
Thermocycler Tprofessional Basic Gradient 96	Biometra
ThermoMixer® comfort 5355	Eppendorf
Ultra Low-Temperature Freezer Innova® U725	Eppendorf
Uvsolo 2 Geldokumentationssystem	Analytik Jena

Vortex-Genie 2
 Weighing Scale A120S
 Zellkulturflaschen
 Zellkulturplatten
 Zentrifuge 5424
 Zentrifuge 5810 R

Scientific Industries
 Sartorius
 Greiner Bio-One
 Corning
 Eppendorf
 Eppendorf

7.2 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 6 | Reagenzien und Enzyme

Reagenz	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH
100bp DNA-Leiter	New England Biolabs
1Kb DNA-Leiter	New England Biolabs
2-Mercaptoethanol, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Propanol (isopropanol)	Carl Roth GmbH
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
BbsI (10,000 units/mL)	New England Biolabs
BsaI (10,000 units/mL)	New England Biolabs
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck
Deoxynukleotide Mix, 10 mM	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
DirectPCR Lysereagenz (Mausschwänze)	Viagen Biotech
dNTP Mix, 10mM	Fermentas GmbH
Eosine	Waldeck
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formalin	Carl Roth
Gelbeladungsfarbstoff, lila (6x)	New England Biolabs
Glycerol	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin	Merck
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen GmbH
Isopropanol	Carl Roth
Isotonische Natriumchloridlösung	Braun Melsungen AG
Kalziumchlorid	Carl Roth
KAPA2G Fast Genotyping Mix	Kapa Biosystems
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KgaA
Penicillin-Streptomycin (5.000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol 4000	Sigma-Aldrich
Potassiumchlorid (KCl)	Carl Roth
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNAlater	Sigma-Aldrich
Rnase-freies Dnase-Set	Qiagen GmbH
RnaseA	Fermentas GmbH
Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth
Sodium chloride (NaCl)	Carl Roth
SuperScript II	Thermo Fisher Scientific
SYBR® Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 DNA Ligasepuffer (10x)	New England Biolabs
T4 Polynukleotidligase	New England Biolabs
TaKaRa Ex Taq DNA-Polymerase	Takara Bio

7.3 Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 7 | Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
FCS Superior	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA (0.5%)	Thermo Fisher Scientific

7.4 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 8 | Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller
Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit L	Lonza
Bond Polymer Refine Detection Kit	Leica
Dneasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (AS1440)	Promega
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen

QIAquick PCR Purification	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen
Turbo DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific

7.5 Reagenzien für die Library Präparation und die Sequenzierung

Tabelle 9 | Reagenzien für die Library Präparation und die Sequenzierung

Reagenz	Hersteller
Agencourt AMPure XP magnetische Beads	Genewiz
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies
EB Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
KAPA DNA Standards und Primer für Illumina	Kapa Biosystems
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x)	Kapa Biosystems
KAPA SYBR Fast qPCR ABI Mix (2x)	Kapa Biosystems
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina®	New England Biolabs
NEBNext® Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina®	New England Biolabs
Nextera XT Kit	Illumina

7.6 Einwegartikel

Tabelle 10 | Einwegartikel

Artikel	Hersteller
CellTrics® Zellfilter	Sysmex
Combitips advanced® (0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL, 5 mL, 10 ml)	Eppendorf
DecKblätter	Gerhard Menzel B.V.
DNA LoBind® Tube (1.5 mL)	Eppendorf
Einwegreservoir	Integra Biosciences
Einwegskalpel	B. Braun Melsungen
Einwegspater	Carl Roth
Folie für PCR Platte	Thermo Fisher Scientific
Hard-Shell® 96-Well PCR-Platte, high-profile, Halbrahmen	Bio-Rad Laboratories
Hard-Shell® Low-Profile Thin-Wall 96-Well PCR Platte	Bio-Rad Laboratories
Kryoröhrchen (1.6 mL)	Sarstedt
MicroAmp® optische 96-well Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp® optischer adhärenter Film	Thermo Fisher Scientific
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Streifen (8 Tubes)	Sarstedt

Petrischale (100 mm)	Greiner Bio-One
Pipettenspitze (10 µL, 200 µL)	Biozym
Pipettenspitze mit Filter (10 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 1250 µL)	Biozym
Reaktionsgefäß sichere Abdichtung (0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL)	Sarstedt
Reaktionsgefäß sichere Abdichtung (5 mL)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (50 mL, 250 mL, 550 mL)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (6-well, 12-well, 24-well, 96-well)	Corning
Zellsiebe (70 µm, 100 µm)	Corning
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One
450GR Zirconium beads 0,1mm	Cole-Parmer

7.7 Bakterienstämme

Tabelle 11 | Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
One Shot® Stbl3TM chemisch kompetente E. Coli Bakterien	Thermo Fisher Scientific

7.8 Plasmide

Tabelle 12 | Plasmide

Plasmid	Quelle
PX333	Addgene #64073

7.9 Guide-RNAs

Tabelle 13 | Sequenzen der eingesetzten Guide-RNAs

Genom: Mus Musculus

Sequenz der Guide RNA	Ziel
GAAACAGCAGTGATGCCAT	Guide 1 intergenische Region 1 downstream von <i>Bcl11b</i>
GTTTGTTTTAAGGAATTAGC	Guide 2 intergenische Region 1 downstream von <i>Bcl11b</i>
GAGAACGGGGAGAGAAATAC	Guide 3 intergenische Region 2 downstream von <i>Bcl11b</i>
GCTCACTGCTTAAGTTCTTG	Guide 4 intergenische Region 2 downstream von <i>Bcl11b</i>

7.10 Primersequenzen

Tabelle 14 | Sequenzen der Primer für die Genotypisierung des intergenischen Knockouts im Zellsystem

Genom: Mus Musculus

Name	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
KO	AACTACAGCTGAACGTCACA	ACTGAACATGGTACACCCAG

WT	AACTACAGCTGAACGTCACA	GACTGCTAGCTGACCACAAT
----	----------------------	----------------------

Tabelle 15 | Sequenzen der Primer für die Validierung der Genotypisierung des intergenischen Knockouts in der Maus

Genom: Mus Musculus

Name	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Wildtyp-1Mb-KO	AGCTCAGGTAATCCTTGTCG	CCTAGGTCATCACTTCCACC
Wildtyp-105Kb-KO	GGTCGTTGATGACAACAATCTC	TAGGTCCCTTACATTCAACCCT
MHPP-Vektor	AGGTGTATCGTGATTCCAC	GCTAAGCCTGGGCTATAACA

Tabelle 16 | Sequenzen der Primer, die für die qPCR verwendet wurden

Genom: Mus Musculus

Name	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>ThymoD</i>	GGGCAGACGAAACTGACTGT	AAGCCCTGCCTTGACTGTAA
<i>Bcl11b</i>	GCCAGTGTGAGTTGTCAGGTAAA	GAACCAGGCGCTGTTGAAG
<i>Gapdh</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CACCACCTTCTTGATGTCATCATAAC

7.11 Zelllinien

Tabelle 17 | Zelllinien

Zelllinie	Quelle
EL4	ATCC (ATCC® TIB-39™)

7.12 Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 18 | Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller
Anti-B220-Antikörper, RA3-6B2, 1:50 Verdünnung	BD Bioscience
Anti-CD3-Antikörper, A0452, 1:100 Verdünnung	DCS
Anti-Tdt-Antikörper, 005, 1:100 Verdünnung	Supertechs
Anti-CD4-Antikörper, GHH4, 1:50 Verdünnung	Dianova
Sekundärer Hasen Anti-Ratten Antikörper, 1:400 Verdünnung	Vectorlabs

7.13 MICER-Vektoren

Tabelle 19 | MICER-Vektoren, die für die Generierung der Knockout-Mausmodelle verwendet wurden

Vektornummer	Vektor	Quelle
MHPN-250E23	5'HPRT, MHPN	Adams et al., 2004
MHPP-53N24	3'HPRT, MHPP	Adams et al., 2004

7.14 Öffentlich zugängliche Daten

Tabelle 20 | Murine öffentlich zugängliche Daten

Daten	Zugang	PMID	Publikation
DNaseSeq HSC bis DP	GEO: GSE79422	29466755	(Hu et al., 2018)
RNA-Seq HSC bis DP	GEO: GSE79422	29466755	(Hu et al., 2018)
HiC früh (HSC bis DN2a)	GEO: GSE79422	29466755	(Hu et al., 2018)
HiC spät (DN2B bis DN3)	GEO: GSE79422	29466755	(Hu et al., 2018)
H3K27ac DP	GEO: GSE61428	25677180	(Ing-Simmons et al., 2015)
H3K4me1 DP	GEO: GSE20898	21867929	(Wei et al., 2011)
Bcl11b DN3	GEO: GSE93572	29466755	(Hu et al., 2018)
Runx1 DP	GEO: GSE44577	24365181	(Lepoivre et al., 2013)
Tcf1 DP	GEO: GSE63732	25872643	(Vanhille et al., 2015)
Satb1 DP	GEO: GSE90635	28494867	(Kakugawa et al., 2017)
CTCF DP	GEO: GSE27214	21349430	(Ebert et al., 2011)

Tabelle 21 | Humane öffentlich zugängliche Daten

Daten	Zugang	PMID	Publikation
H3K4me1 in T-Zellen	Encode: ENCSR915OQE	32728046	(Zhang et al., 2020)
H3K27ac in T-Zellen	Encode: ENCSR222QLW	32728046	(Zhang et al., 2020)
DNaseSeq in T-Zellen	Encode: ENCSR934IKS	32728249	(Consortium et al., 2020)

7.15 Softwares

Tabelle 22 | Verwendete Softwares

Software	Entwickler
AxioVision 4.8	Carl Zeiss AG
EndNote X7	Thomson Reuters
FlowJo	BD Biosciences
Genomic Workbench 7	Agilent Technologies
GraphPad Prism5	GraphPad Software
Illumina Sequence Analysis Viewer 2.4.5	Illumina
Inkscape	Inkscape-Projekt
Molecular Signature Database (http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp)	Broad Institute
Odyssey® v1.2	Li-Cor Biosciences
Office 2019	Microsoft Corporation
R Software Environment R version 4.0.1	The R Project, The R Foundation
Snapgene 3.1	GSL Biotech

7.16 Hersteller

Tabelle 23 | Hersteller

Hersteller	Firmensitz
Supertechs	Rockville, Maryland, USA
Inkscape	Chino Hills, California, USA
Addgene	Cambridge, Massachusetts, USA
Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, CA, USA
Analytik Jena AG	Jena, Deutschland
Applied Biosystems, Inc.	Carlsbad, CA, USA
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
BD Biosciences, BD, Inc.	Franklin Lakes, NJ, USA
Bertin Instruments	Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA, USA
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Corning, Inc.	Corning, NY, USA
Cole-Parmer	Vernon Hills, Illinois, USA
DAKO, Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, CA, USA
DCS	Hamburg, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eurofins Genomics GmbH	Ebersberg, Deutschland
Feather Safety Razor Co., Ltd.	Osaka, Japan
Genewiz, Inc.	South Plainfield, NJ, USA
GraphPad Software, Inc.	San Diego, CA, USA
Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
GSL Biotech LLC	Chicago, IL, USA
Illumina, Inc.	San Diego, CA, USA
Integra Biosciences AG	Biebertal, Deutschland
Kapa Biosystems, Inc.	Wilmington, MA, USA
Macherey-Nagel GmbH	Düren, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Microsoft Cooperation	Redmond, Washington, USA
neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs, Inc.	Ipswich, MA, USA
Promega	Madison, Wisconsin, USA
Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland

R&D Systems, Inc.	Minneapolis, MN, USA
Sarstedt AG	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Scientific Industries, Inc.	Bohemia, NY, USA
Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, MO, USA
Takara Bio, Inc.	Kyoto, Japan
The R Project, The R Foundation	Vienna, Österreich
Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V.	Braunschweig, Deutschland
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, MA, USA
Vectorlabs	Burlingame, CA, USA
Viagen Biotech, Inc.	Los Angeles, CA, USA
VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Waldeck GmbH	Münster, Deutschland
Lonza	Basel, Schweiz
LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Hessen, Deutschland
Leica Biosystems	Nußloch, Deutschland

8. Methoden

8.1 Tierexperimente

Die Tierexperimente erfolgten im Wellcome Trust Sanger Institut in Hinxton/ Cambridge. Die Mäuse wurden in den Tiereinrichtungen unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere waren einem 12 Stunden hell/dunkel-Zyklus ausgesetzt und hatten Futter und Wasser ad libitum. Alle Experimente waren in Einklang mit den europäischen Richtlinien und wurden von den lokalen Behörden genehmigt.

Die Nekropsie der Mäuse erfolgte im Wellcome Trust Sanger Institut. Es wurden Proben vom Tumor, von allen Organen und geschwollenen Lymphknoten für die Histologie in Paraffin eingebettet. Außerdem wurde Tumorgewebe und Gewebe aus den Schwänzen der Mäuse in RNALater bei -20°C eingefroren. Es wurde auch von einigen jungen gesunden Tieren ohne Tumor Gewebe aus zahlreichen Organen für weitere Analysen weggefroren.

8.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Wellcome Trust Sanger Institut in Hinxton/ Cambridge im Labor von Herrn Professor Allan Bradley.

Zur Nachkontrolle wurden 11 Mäuse mit dem 105Kb-Knockout und sieben Mäuse mit dem 1Mb-Knockout im Rahmen dieser Doktorarbeit reagentypisiert. Die DNA wurde aus Mausschwänzen isoliert. Hierfür wurde das Gewebe über Nacht mit 50 µL DirectPCR Lysereagenz und 20µg/mL Proteinase K auf 55°C inkubiert. Die Proteinase K wurde dann bei 95°C für 15 Minuten hitzeinaktiviert und die DNA, nach 1/10-Verdünnung mit Wasser, bei -20°C gelagert.

Die Reagentypisierung erfolgte mit folgenden Reagenzien:

Reagenz	Menge
DNA	50-100 ng
KAPA2G Fast Genotyping Mix	10 µL
Vorwärtsprimer	1 µL
Rückwärtsprimer	1 µL
H ₂ O	auf 20 µL auffüllen

Für die Genotypisierung des 1Mb-KO wurden die Wildtyp-1Mb-KO-Primer sowie die MHPP-Vektor-Primer verwendet. Für den Nachweis des 105Kb-KO wurden die Wildtyp-105Kb-KO-

Primer und die MHPP-Vektor-Primer eingesetzt. Die Sequenzen sind im Materialteil aufgelistet.

Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler mit folgenden Einstellungen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 Min.	1
95°C	20 Sek.	35
57°C	20 Sek.	35
72°C	1 Min.	35
72°C	2 Min.	1
12°C	Pause	-

8.3 Histologie, H&E-Färbung und Immunhistochemie

Die makroskopische Analyse der Tumore sowie die Fixierung des Gewebes in Formalin, die anschließende Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von H&E-Schnitten erfolgte im Wellcome Trust Sanger Institut im Labor von Herrn Prof. Allan Bradley in Hinxton. Die Schnitte von hämatologischen Tumoren sowie die immunhistochemische Färbung gegen CD3, B220, CD4 und Tdt erfolgte in der Pathologie der Technischen Universität München.

Die histologische Subklassifizierung der soliden und hämatopoietischen Tumore erfolgte in der Pathologie der Technischen Universität München durch Dr. med. vet. Katja Steiger und Dr. med. vet. Hsi-Yu Yen anhand der Makroskopie und von H&E-Schnitten.

Die hämatopoietischen Tumore wurden nach den Bethesda-Vorschlägen für die Klassifizierung von neoplastischen hämatopoietischen Tumoren der Maus weiter subcharakterisiert (Morse et al., 2002). Neben den H&E-Schnitten wurden die Tumore mit Antikörpern gegen CD3, B220, CD4 und Tdt immunhistochemisch gefärbt. Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte für die CD3- und B220-Färbungen mit einem Citratpuffer und für die Tdt-Färbung mit einem EDTA-Puffer für 20 Minuten. Für die Anti-CD4-IHC wurden die Proben in EDTA-Puffer für 40 Minuten inkubiert. Der Anti-CD3-Antikörper wurde in eine 1:100-Verdünnung, der Anti-B220- und Anti-CD4-Antikörper in eine 1:50-Verdünnung und der Anti-Tdt-Antikörper in eine 1:100-Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Bond Polymer Refine Detektion-Kit der Firma Leica.

8.4 DNA-Extraktion aus den Maustumoren

Für weitere Analysen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit DNA aus den Maustumoren und -schwänzen mit dem Dneasy Blood & Tissue Kit von Qiagen isoliert.

Wie vom Hersteller angegeben, wurden kleine Stücke (etwa 10-20 mg) des Tumorgewebes und größere Stücke aus den Schwänzen der Mäuse (0,5 cm) mit einer sterilen Einweg-Skalpellklinge geschnitten. Dies erfolgte in einzelnen Einweg-Plastikschalen, damit es zu keiner Zeit zu einer Kreuzkontamination kommen kann. Anschließend wurden diese über Nacht bei 56°C in einer Proteinase-K-Lösung inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie von Qiagen angegeben mit den vorhandenen Säulen und Puffern. Die DNA wurde in 100 µL AE-Puffer gelöst.

Die finale Konzentration der DNA in den Proben wurde auf dem Qubit-Fluorometer mit einem für doppelsträngige DNA spezifischen Farbstoff gemessen.

Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

8.5 Whole-Genome-Sequenzierung (WGS)

Die DNA der Maustumore und -schwänze wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit der Hilfe von Dr. Rupert Oellinger, ein Postdoktorand unserer Arbeitsgruppe, sequenziert. Die DNA wurde auf eine Konzentration von etwa 15,4 ng/µL verdünnt, sodass 200 ng DNA in 13 µL enthalten sind.

Die folgenden Schritte erfolgten mit dem NEBNext®Ultra™ II DNA Library Prep Kit von New England Biolabs nach Herstellerangaben. Zuerst wurde die DNA fragmentiert, die Enden repariert und ein dA-Tailing durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Ligation der Adapter-Sequenzen für die Illumina Sequenzierplattform und die DNA wurde mit magnetischen Perlen aufgereinigt. Dann wurden die Sequenzen mit spezifischen Primern für die Illuminaadapter i5 und i7 amplifiziert und erneut aufgereinigt.

Nach der Vorbereitung der Library für die Sequenzierung, erfolgte die finale Quantifizierung der DNA mit dem KAPA SYBR Fast qPCR ABI Mix und spezifischen Primern für die Adaptersequenzen von Illumina mit folgenden qPCR-Einstellungen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 Min.	1
95°C	15 Sek.	30
60°C	45 Sek.	30

Die DNA wurde daraufhin so verdünnt, dass 10 Nanomolar in 40 µL enthalten sind und jeweils 5 µL von jeder Probe wurden zu einer gepoolten Library zusammengemischt. Die DNA-Qualität dieser gepoolten Library wurde daraufhin, wie vom Hersteller angegeben, auf dem Bioanalytiker von Agilent geprüft und die finale Konzentration wurde wie zuvor mithilfe einer qPCR gemessen. Die Sequenzierung erfolgte auf einem NovaSeq 6000 von Illumina am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Das Mapping der Reads und das weitere Prozessieren der Daten erfolgte durch Thomas Engleitner, wie in der Studie von Lange et al. aus unserem Labor beschrieben (Lange et al., 2020). Auch die Generierung der Plots wird in dieser Studie beschrieben.

8.6 RNA-Isolierung

Mithilfe des Rneasy Plus Mini Kits von Qiagen wurde RNA im Rahmen dieser Doktorarbeit aus dem Thymus von gesunden Mäusen und aus Tumorgewebe isoliert: 24 Proben aus Tumoren und 14 Proben aus gesundem Thymus. Hinzu kamen fünf Thymusproben von Kontrollmäusen. Wie vom Hersteller angegeben, wurden kleine Stücke (etwa 10-20 mg) des Thymus oder des Tumors der Tiere mit einer sterilen Einweg-Skalpellklinge abgetrennt und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Dies erfolgte in einzelnen Einweg-Plastikschalen, damit es zu keiner Zeit zu einer Kreuzkontamination kommen kann. Anschließend wurden 600 µL RLT-Plus-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µL β-Mercaptoethanol für 1 mL RLT-Plus-Puffer) und Zirconium-Beads hinzugefügt und alles in einem Precellys® Homogenisator bei 5000 rpm für 15 Sekunden homogenisiert. Die anschließende Säulenextraktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde in 40 µL Rnase-freiem Wasser eluiert.

Die finale Konzentration der RNA in den Proben wurde auf dem Qubit-Fluorometer mit einem für RNA spezifischen Farbstoff gemessen und die Proben wurden daraufhin für die weitere Lagerung bei -80°C weggefroren.

8.7 cDNA-Synthese und qPCR

Die RNA der gesunden Mäuse aus beiden Kohorten und der Kontrollmäuse wurde im Rahmen dieser Arbeit in cDNA umgeschrieben: die reverse Transkription erfolgte nach dem SuperScript II Protokoll von Thermo Fisher mit 1 µg RNA und einer Mischung aus oligo(dT)-Primern und Zufalls-Hexamer.

Die anschließende quantitative PCR erfolgte mit dem SYBR® Select Master Mix von Thermo Fisher Scientific. Spezifische Primer für *Bcl11b* und für das Haushaltsgen *Gapdh* wurden

mithilfe der Software Primer-Blast von NCBI entworfen. Die Sequenzen der Primer für *ThymoD* stammen aus der Studie von Isoda et al. (Isoda *et al.*, 2017b). Für das Primergemisch wurden jeweils 2 µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer (100 µM) mit 196 µL Wasser vermengt und die weiteren Reagenzien nach nachfolgendem Schema hinzugefügt:

Reagenz	Menge
SYBR® Select Master Mix (2X)	5 µL
Primergemisch	2 µL
H ₂ O	0,5 µL
cDNA	2,5 µL

Die qPCR erfolgte mithilfe der StepOne™-Software und folgenden Einstellungen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 Min.	1
95°C	15 Sek.	40
60°C	1 Min.	40

Die Ct-Werte wurden aus der StepOne Software exportiert und die Daten anschließend mit Excel 2019 von Microsoft ausgewertet: die Expression von *Bcl11b* und *ThymoD* in den Knockout-Mäusen wurde jeweils mit der Expression des Haushaltsgens *Gapdh* normalisiert und in Verhältnis zu den Werten der Kontrollmäuse gesetzt.

8.8 RNA-Isolierung aus FFPE-Gewebe

Für eine spätere Sequenzierung wurde RNA aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Proben der T-ALL-Tumore aus beiden KO-Mausmodellen im Rahmen dieser Arbeit extrahiert: 11 Proben für den 1Mb-KO und fünf Proben für den 105Kb-KO. Es wurden für jede Probe fünf FFPE-Schnitte mit je 10 µm Durchmesser auf Objektträger gezogen und die Areale mit Leukämiezellen von Frau Dr. vet. Katja Steiger aus dem pathologischen Institut der Technischen Universität München anhand der H&E- und IHC-Färbungen markiert. Für die nachfolgende Extraktion der RNA wurde das Maxwell® RSC RNA FFPE Kit von Promega verwendet.

Wie vom Hersteller beschrieben, wurden zuerst die markierten Areale von den Objektträgern mit sterilen Einweg-Skalpellklingen heruntergekratzt und in ein 1,5 mL Röhrchen überführt.

Die nächsten Schritte wurden, wie im Protokoll von Promega beschrieben, durchgeführt. Die eigentliche Extraktion erfolgte auf einem Maxwell[®] RSC 48 Gerät von Promega, das uns von Frau Dr. Nicole Pfarr aus der Pathologie unter ihrer Anleitung zur Verfügung gestellt wurde. Die noch in der Probe vorhandene DNA wurde mit dem Turbo DNA-free[™] Kit von Thermo Fisher Scientific verdaut. Es wurde zu jeder Probe 10 µL von folgendem Gemisch aus den Reagenzien des Kits hinzugefügt:

Reagenz	Menge
Wasser	3 µL
10x Turbo Dnase Puffer	5 µL
Turbo Dnase	2 µL

Die Proben wurden daraufhin 25 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 2 µL Dnase-Inaktivierungspuffer hinzugegeben. Nach 5 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur wurde das Pellet entfernt, das sich nach 2-minütiger Zentrifugation bei 10 000 rpm gebildet hat.

Die finale Konzentration der RNA wurde auf dem Qubit-Fluorometer mit einem für RNA-spezifischen Farbstoff gemessen und die Proben wurden daraufhin für die weitere Lagerung bei -80°C weggefroren.

8.9 RNA-Sequenzierung

Die RNA aus dem FFPE-Material, aus dem Tumorgewebe und aus dem Thymus von Kontrollmäusen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit der Hilfe von Dr. Rupert Oellinger, wie bereits früher beschrieben, sequenziert (Parekh et al., 2016; Weber *et al.*, 2019). Die RNA wurde mit einer Maxima RT Polymerase von Thermo Fisher Scientific mit oligo(dT)-Primern, die einen Barcode, ein UMI („Unique Molecular Identifier“) und eine Adaptersequenz enthalten, in cDNA umgeschrieben. Mit einer Template-Switching-PCR mit speziellen Oligonukleotiden wurde anschließend die cDNA verlängert und mit spezifischen Primern für diese Sequenz amplifiziert (Weber *et al.*, 2019). Eine Library wurde mithilfe des NEBNext[®] Ultra II DNA Library Prep Kit von New England Biolabs generiert: die cDNA wurde tagmentiert, die Enden repariert, mit einem A-Tail versehen und schließlich die 3'-Enden mit Primern mit Illumina-spezifischen Überhängen (P5 und P7) amplifiziert. Für eine bessere Cluster-Erkennung wurden die P5- und P7-Überhänge im Vergleich zur Studie von Parekh et al. vertauscht, damit die cDNA im ersten Read und der Barcode und das UMI im zweiten Read

sequenziert werden (Parekh *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2019). Die Sequenzierung erfolgte auf einem NextSeq 500 von Illumina mit 63 Zyklen für die cDNA und 16 Zyklen für den zweiten Read (Weber *et al.*, 2019). Die Sequenzierdaten wurden von unserem Bioinformatiker Thomas Engleitner weiter ausgewertet. Mit der veröffentlichten Drop-Seq Pipeline (v1.0) konnten Gen- und Proben-spezifische UMI-Tabellen generiert werden (Macosko *et al.*, 2015; Mueller *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2019). Für das Sequenzalignment wurde das Mausreferenzgenom (GRCm38) verwendet und die Gentranskripte wurden aus GENCODE (Version M25) importiert. Die initialen Cluster-Analysen erfolgten wie in Müller *et al.* beschrieben mit 10% der Gene mit der höchsten Expressions-Variabilität (Mueller *et al.*, 2018). Die Analyse für differenziell exprimierte Gene zwischen den Clustern erfolgte mit DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Es wurde definiert, dass ein Gen bei einem log₂-Wert („fold change“) über 0,8 und einem p-Wert unter 0,05 als differentiell reguliert angesehen wird. Die „Molecular Signature Database“ (MSigDB) v7.2 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) wurde für Gen-Set-Anreicherungsanalysen verwendet.

8.10 CRISPR/Cas9-Knockout eines Enhancers in einer Zelllinie

Eine intergenische Region downstream von *Bcl11b* (chr12:106307199-106313168) wurde in der murinen T-Zell-Lymphom-Zelllinie EL4 mit CRISPR/Cas9 im Rahmen dieser Arbeit ausgeknockt.

Die Kultivierung der EL4-Zelllinie erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 20% FCS (Biochrom) und 1% Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Die Zellen wurden in 250 mL Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) in einem Inkubator bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ gelagert und alle zwei Tage 1/10 gesplittet.

Die benötigten Single Guide RNAs (sgRNA) wurden mit einem Online-Tool designed (<http://crispor.tefor.net>) und die Zielsequenzen stammen aus dem neuesten Referenzgenom der Maus (GRCm38). Das Online-Tool erkennt sgRNAs mit einer hohen Effizienz und einer niedrigen Rate an Off-target-Effekten, sowie die angrenzende PAM-Sequenz. Für jede Seite der erwünschten Knockout-Region, die etwa 6 Kb groß ist (chr12:106307199-106313168), wurden zwei sgRNA gewählt. Auf jeder Seite (Region 1 und 2) lagen diese untereinander 200-400 Basenpaare voneinander entfernt.

Die sgRNAs wurden in den pX333-Vektor von Addgene kloniert. Dieser exprimiert Cas9 unter einem CAG-Promoter, zwei Guide-RNAs unter U6-Promotoren und eine Resistenz gegen Ampicillin als Selektionsmarker. Für die Klonierung wurden für jede gRNA die Vorwärts- und

Rückwärtsoligonukleotide hybridisiert, indem sie 5 Minuten auf 95°C inkubiert und durch Abschalten des Heizblocks langsam wieder auf Raumtemperatur heruntergekühlt wurden. Anschließend erfolgte eine Golden-Gate-Klonierung, um die erste gRNA in den Vektor einzufügen, mit folgenden Reagenzien und Thermocycler-Einstellungen:

Reagenz	Menge
pX333-Vektor (90 ng/μL)	1 μL
Hybridisierte Oligonukleotide	1 μL
T4 DNA Ligase Puffer (10x) (NEB)	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
BbsI Restriktionsenzym	1 μL
H ₂ O	14 μL

Temperatur	Zeit	Zyklen
37°C	5 Min.	10
16°C	10 Min.	10
55°C	5 Min.	1
80°C	5 Min.	1
10°C	Pause	-

Für die Vervielfältigung des Plasmids, wurden chemisch kompetente Stb13TM-Bakterien durch 20-minütige Inkubation auf Eis und 10 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Gemisch aus 20 μL KCM-Puffer (500 mM KCL, 150 mM CaCl₂ und 250 mM MgCl₂), 10 μL Vektor und 70 μL Wasser transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einer Agarplatte mit 100 mg/mL Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C vermehrt. Am nächsten Tag konnte jeweils eine Kolonie gepickt und 5 mL LB-Medium damit inokuliert werden. Die Flüssigkultur wurde daraufhin auf einem Schüttler bei 37°C über Nacht angezogen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen. Eine zweite Guide-RNA wurde mit dem gleichen Protokoll in denselben Vektor eingebracht, jedoch wurde dieses Mal das Restriktionsenzym BsaI statt BbsI für die Golden-Gate-Klonierung verwendet. Eine gRNA auf der einen Seite des Knockouts (Region 1) wurde mit einer gRNA auf der anderen Seite des Knockouts (Region 2) auf dem Vektor kombiniert, sodass vier verschiedene Vektorkonstrukte möglich sind. Die fertigen

Plasmide wurden bei -20°C gelagert und $500\ \mu\text{L}$ Bakterienflüssigkultur mit Vektor wurden in 25% Glycerol bei -80°C weggefroren. Die Sequenzen wurden durch Sanger-Sequenzierung überprüft. Da für die spätere Elektroporation höhere Konzentrationen benötigt werden, wurde schließlich eine 250 mL LB-Flüssigkultur mit den Glycerol-Stocks der vektortragenden Bakterien inokuliert und die DNA mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation mit dem Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit L und dem Nucleofector™ 2b von Lonza. Ein spezifisches Protokoll für die EL4 Zelllinie wurde vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Dem Protokoll folgend, wurden zwei Millionen Zellen in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen herunterzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die vier Plasmide mit den verschiedenen Vektoren gemischt und $2\ \mu\text{g}$ der Lösung mit $0,5\ \mu\text{g}$ eines im Kit enthaltenen GFP-Plasmids zusammengefügt. Die Zellen wurden daraufhin in einem Gemisch aus $82\ \mu\text{L}$ Nucleofektorlösung, $18\ \mu\text{L}$ Supplement und der Plasmid-DNA resuspendiert, in dem Nucleofektor mit dem Programm C-009 elektroporiert und in eine 12-well Platte mit 2 mL Zellkulturmedium überführt. Als Kontrolle wurden Zellen ausschließlich mit GFP-Plasmid transfiziert.

Nach 36 Stunden wurden mit einem FACSAria™ III Zellsortierer von BD (Zellanalyse Zentraleinheit des TranslaTUMs, Arbeitsgruppe Herr Professor Dr. Ruland) Einzelzellklone in eine unbeschichtete 96-well-Kulturplatte mit konditioniertem Medium überführt: zwei Platten mit Einzelklonen für die Zellen mit dem Knockout und eine Platte für die Kontrollzellen. Das konditionierte Medium besteht aus 50% gefiltertem ($70\ \mu\text{m}$ Filter) Überstand der EL4-Zellkultur, 40% frischem Zellkulturmedium und 10% FCS.

Nach einer Woche wurde aus den Wells, in den Einzelzellklone angewachsen sind, $100\ \mu\text{L}$ Zellsuspension in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und herunterzentrifugiert. Für die DNA-Extraktion wurde das Zellpellet in $50\ \mu\text{L}$ DirectPCR Lysereagenz und $20\ \mu\text{g/mL}$ Proteinase K resuspendiert und auf 55°C für eine Stunde inkubiert. Diese DNA-Lösung konnte daraufhin direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet werden.

Um den Knockout in den Zellklonen nachzuweisen, erfolgte eine Touchdown-PCR mit folgenden Reagenzien und Thermocycler-Einstellungen:

Reagenz	Menge
DNA	1 µL
KAPA2G Mix	5 µL
Vorwärtsprimer	1 µL
Rückwärtsprimer	1 µL
H ₂ O	2 µL

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 Min.	1
95°C	20 Sek.	10
65° (-1°C pro Zyklus)	20 Sek.	10
72°C	1 Min.	10
95°C	20 Sek.	25
55°C	20 Sek.	25
72°C	1 Min.	25
72°C	2 Min.	1
10°C	Pause	--

Als Primer wurden die Knockout-Region flankierende Primer, sowie Primer für die Wildtyp-Sequenz verwendet. Die Sequenzen sind in Tabelle 14 angegeben. Die Klone, die eine Deletion des Enhancers aufwiesen, wurden für die spätere RNA-Extraktion in ein 6-Well überführt und in 5 mL Medium expandiert.

Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des Rneasy Plus Mini Kit von Qiagen bei einer Konzentration von etwa 1 Millionen Zellen pro Milliliter in jedem 6-Well. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in 600 µL RLT-Plus-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µL β-Mercaptoethanol für 1 mL RLT-Plus-Puffer) resuspendiert und mit QIAshredder-Säulen von Qiagen nach Herstellerangaben homogenisiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der RNA-Extraktion aus Gewebe, die unter 8.6 beschrieben wurde.

Die cDNA-Synthese, qPCR und weitere Analyse erfolgten wie unter 8.7 beschrieben. Es wurden dieselben Primer wie bei 8.7 für *Bcl11b* und *Gapdh* verwendet.

9. Ergebnisse

Einige Inhalte und Abbildungen stammen aus einem Manuskript, zu dem diese Arbeit maßgeblich beigetragen hat (Fischer et al., 2023). Die Grundlage dieser Studie bildete der PiggyBac-Transposonscreen aus derselben wissenschaftlichen Arbeit und aus der Doktorarbeit von Anja Fischer.

Die Generierung und Genotypisierung der Mauskohorten mit 1Mb- und 105Kb-KO und die Tierhaltung erfolgten im Labor von Herrn Professor Allan Bradley. Die anschließende umfassende Charakterisierung und Interpretation beider Mausmodelle sowie die weiteren funktionellen Analysen erfolgten im Rahmen dieser Doktorarbeit im Labor von Herrn Professor Dr. Roland Rad.

Der Beitrag von Coautoren bei Laborexperimenten und bioinformatischen Analysen wurde im Methodenteil oder in den Abbildungslegenden angegeben.

9.1 Rezidivierende Insertionen downstream von *Bcl11b* in einem T-ALL *PiggyBac* Transposon-Screen in der Maus

Die Grundlage dieser Arbeit bildet ein Ganzkörper *PiggyBac*-Transposon-Screen unseres Labors (Fischer et al., 2023). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können Transposon-Screens in der Maus für die Identifizierung von neuen Krebsgenen genutzt werden (Dupuy et al., 2005; Friedrich et al., 2017; Rad et al., 2010). Mithilfe einer Transposase wird das Transposon im Mausgenom mobilisiert und je nach Orientierung und Mobilisierungsort im Genom, werden so Gene durch den im Transposon enthaltenen Promotor aktiviert oder durch Gen-Trapping mithilfe eines Spleiß-Acceptors und eines Polyadenylierungssignals inaktiviert (Dupuy et al., 2005; Friedrich et al., 2017; Rad et al., 2010). Eine Anhäufung von Transposon-Insertionen in einem bestimmten Bereich des Genoms von entstandenen Tumoren („Common Insertion Site“, CIS), weist auf ein Krebskandidatengen in dieser Region hin (de la Rosa et al., 2017; Friedrich et al., 2017; Rad et al., 2010; Rad et al., 2015; Weber et al., 2019). Über ein Drittel der CIS überlappt jedoch mit regulatorischen Regionen des Genoms (Weber et al., 2020) und es fehlt bisher noch an Studien, die die Relevanz in der Tumorigenese systematisch untersucht haben.

Bei einem Ganzkörper-Transposon-Screen unseres Labors mit einem ATP2-Transposon, das insbesondere im hämatopoietischen System aktiv ist, wurde die Rolle von intergenischen Insertionen in der Evolution der T-ALL das erste Mal funktionell systematisch untersucht (Fischer et al., 2023). Durch die quantitative Sequenzierung (Friedrich et al., 2017) der T-Zell-

Leukämie Kohorte (n = 51) konnten rezidivierende Insertionen downstream von *Bcl11b* gemapt werden (Abb. 2). Die entsprechenden CISs überlappen mit Histonmodifikationen (H3K4me1 und H3K27ac) und offenem Chromatin (Dnase-Seq), die charakteristisch für aktive cis-regulatorische Elemente sind (Shlyueva *et al.*, 2014). Hi-C-Methoden zeigen Wechselwirkungen zwischen diesen Enhancerelementen und dem Promoter des Gens *Bcl11b* in den frühen (HSC bis DN2a) und vor allem späten (DN2b bis DP) Phasen der T-Zellentwicklung (Abb. 2b).

In dieser Studie wurde die Rolle dieser intergenischen Region in der T-ALL-Entstehung funktionell untersucht.

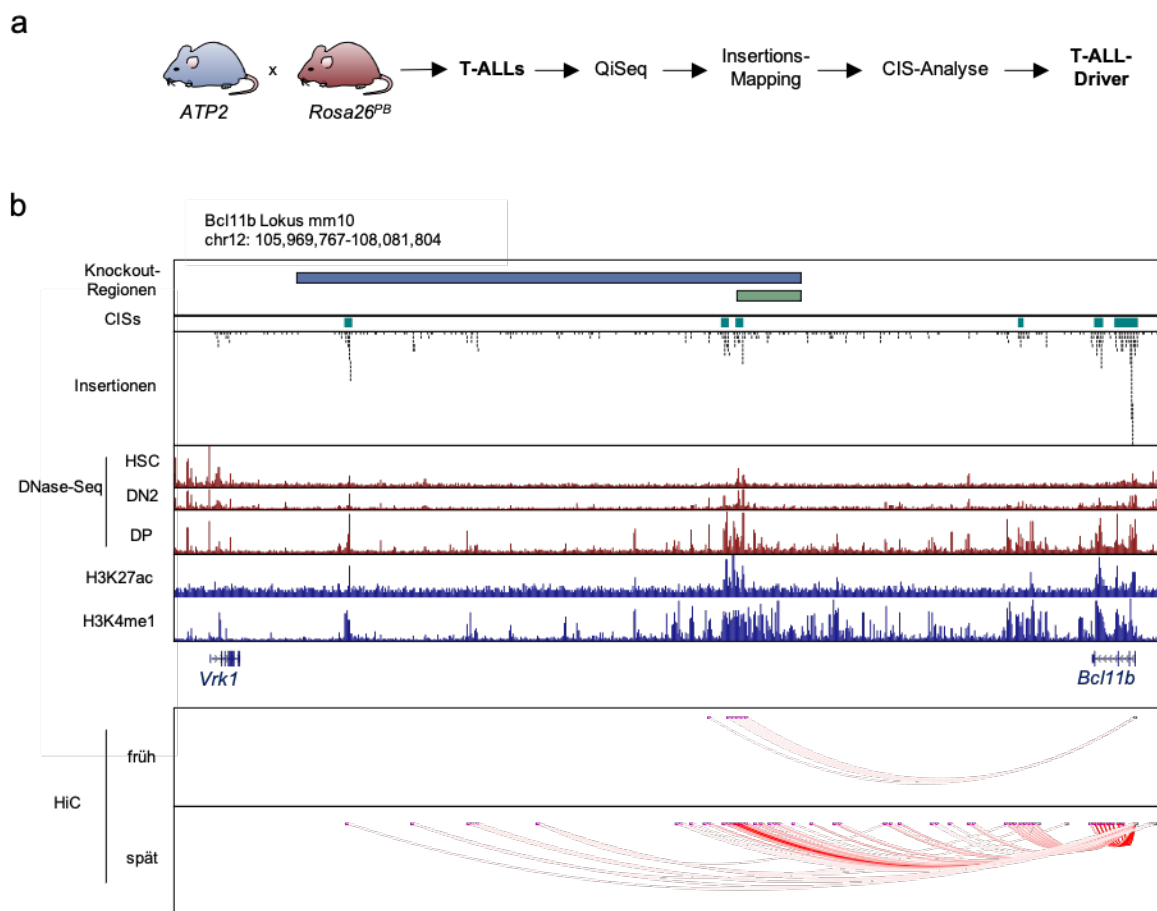


Abbildung 2 | Rekurrente Insertionen downstream von *Bcl11b* in einem *PiggyBac*-T-ALL-Mutagenescreen.

a, Mausepaarungsschema und Workflow für den ATP2 Ganzkörper *PiggyBac*-Transposonscreen, in dem die T-ALL-Tumore weiter analysiert wurden. Das ATP2-Transposon wird durch die Verpaarung mit einer Transposase-Maus (*Rosa26^{PB}*) mobilisiert. **b**, Insertionen des Screens im intergenischen Lokus downstream von *Bcl11b* überlappen mit entsprechenden Enhancer-Markern. Die Knockout-Regionen beziehen sich auf beide in dieser Studie charakterisierten 1Mb- und 105Kb-KO Mausmodelle. HiC-Methoden zeigen Wechselwirkungen zwischen dem Promoter von *Bcl11b* und den CIS („Common Insertion Site“, statistisch nicht durch Zufall erklärbar Anhäufung an Transposoninsertionen) in der frühen (HSC bis DN2a) und späten (DN2b bis DP) T-Zelldifferenzierung, die auf eine regulatorische Funktion in der Entwicklung von T-Zellen hindeutet. Die Hi-C-, DNase-Seq- und Histonmarker-Daten stammen aus öffentlich zugänglichen Quellen (in Tabelle 20 angegeben). Insertionsdaten und CIS stammen aus einer Arbeit unseres Labors (Fischer *et al.*, 2023). **a-b**, Die Generierung der

Daten und die bioinformatischen Analysen wurden insbesondere von Anja Fischer durchgeführt. Die gesamte Abbildung wurde aus (Fischer *et al.*, 2023) abgeändert.

9.2 Strukturelle und funktionelle humane Syntänie der intergenischen Region downstream von *BCL11B*

In dieser Studie wurde die Rolle der intergenischen Region downstream von *Bcl11b* in der T-ALL untersucht. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte überwiegend in der Maus, weshalb die Untersuchung der humanen Syntänie der identifizierten Enhancerelemente eine maßgebliche Voraussetzung für die humane Relevanz dieser Studie ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb primär die Homologie dieses Locus zwischen Mensch und Maus herausgearbeitet.

Sowohl im Menschen als auch in der Maus (Abb. 3) befindet sich eine über 1 Megabase große intergenische Region zwischen den Genen *BCL11B* und *VRK1*, in der lediglich nicht kodierende RNA annotiert ist (Gencode Version M25). Mehrere Bereiche zeigen in T-Zellen von beiden Spezies epigenetische Histonmodifikationen (H3K4me1 und H3K27ac) und offenes Chromatin (Dnase-Seq), die charakteristisch für aktive Enhancer sind (Shlyueva *et al.*, 2014). Insbesondere drei Regionen fielen hierbei auf und sind in Abbildung 3 markiert. Syntänie-Analysen dieser Bereiche zwischen Mensch und Maus zeigten auf Sequenzebene (UCSC, Blat-Tool) eine starke Konservierung (87,4-88,5%) über bis zu 30 Kilobasen.

Diese Analysen deuten somit daraufhin, dass sich sowohl im humanen als auch im murinen Genom eine potentielle cis-regulatorische Region downstream von *Bcl11b* befindet, die zwischen beiden Spezies hoch konserviert ist. Ein Super-Enhancer, der funktionell mit dem nichtkodierenden Transkript *ThymoD* (*Gm16084*) assoziiert ist, wurde in der T-Zellentwicklung bereits charakterisiert (Isoda *et al.*, 2017b; Li *et al.*, 2013). Neben diesem Bereich befinden sich jedoch noch weitere potenzielle regulatorische Regionen, die bisher noch unbeschrieben sind.

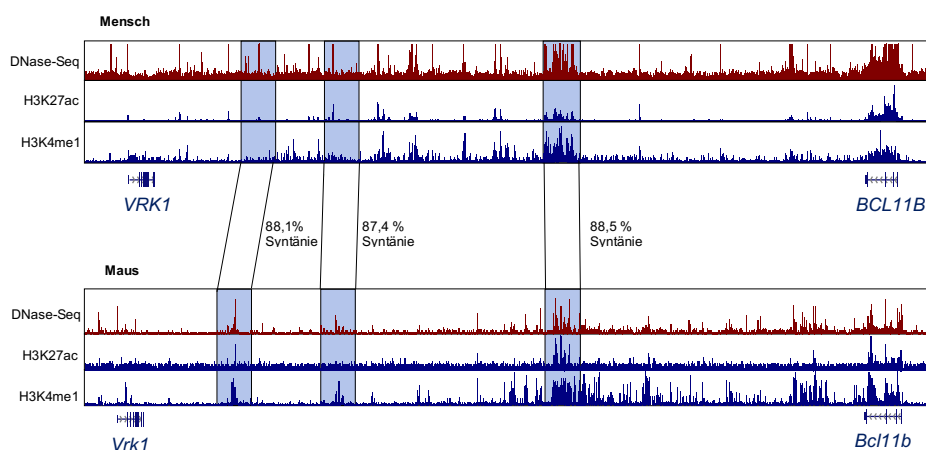


Abbildung 3 | Hohe Konservierung einer intergenischen Region downstream von *Bcl11b* in T-Zellen.

Intergenische Region downstream von *BCL11B* im Menschen (oben; hg38, chr14:96,659,799-99,372,366) und in der Maus (unten; mm10, chr12:105,929,058-108,069,992). Mehrere Regionen zwischen *BCL11B* und *VRK1* überlappen mit den Enhancer-Markern H3K27ac, H3K4me1 und offenem Chromatin (Dnase-Seq) in humanen und murinen T-Zellen. Potentiell aktive regulatorische Bereiche, die in beiden Spezies auf Sequenzebene eine starke Syntanie zeigen, sind umrahmt. Die Daten stammen aus frei zugänglichen Quellen: die Referenzen und der Zugang für die humanen Daten sind in Tabelle 21 und für die murinen Daten in Tabelle 20 angegeben. Gene wurden aus der aktuellen GENCODE-Annotation (muriner Release M25, GRCm38.p6 und humaner Release 36, GRCh38.p13) importiert. Die Abbildung ist adaptiert vom UCSC Genome Browser.

9.3 Funktionelle Auswirkung der Deletion der intergenischen Region downstream von *Bcl11b*

Um die Rolle der cis-regulatorischen Region von *Bcl11b* funktionell zu untersuchen, wurden zwei Mausmodelle mit Deletionen, die mit diesen funktionellen cis-regulatorischen Elementen überlappen, generiert. Die Generierung, Tierhaltung sowie Genotypisierung erfolgte im Labor von Herrn Prof. Allan Bradley im Wellcome Trust Sanger Institut in Hinxton.

Mithilfe des in der Einleitung beschriebenen MICER-Systems konnte eine 1,09 Megabasen (1Mb-KO, chr12:106189991-107268901) und eine 105 Kilobasen (105Kb-KO, chr12:107165848 -107268901) große Deletion in embryonalen Stammzellen der Maus erzeugt werden (Adams *et al.*, 2004). MHPN-250E23- und MHPP-53N24-MICER-Vektoren induzierten den 1Mb-KO, MHPN-262H24 und MHPP-53N24-Vektoren den 105Kb-KO. Die Targeting-Konstrukte stammen aus der 3'Hprt (MHPP) und 5'Hprt (MHPN) MICER-Library (Adams *et al.*, 2004). Nach Injektion der Stammzellen in eine Mausblastozyste und dem in der Einleitung beschriebenen Mauspaarungsschema, konnten die 1Mb- und 105Kb-KO Mauskohorten generiert werden (Adams *et al.*, 2004; Yu and Bradley, 2001) (Abb. 4).

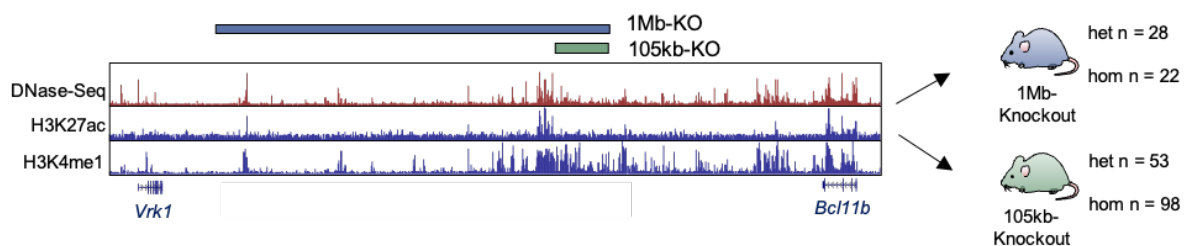


Abbildung 4 | Generierung eines intergenischen 1Mb- und 105Kb-KO downstream von *Bcl11b* in der Maus.

a, 1Mb-KO (n = 50) und 105Kb-KO (n = 151) Mäuse wurden im Wellcome Trust Sanger Institut in Hinxton/Cambridge im Labor von Herrn Prof. Allan Bradley mit Vektoren aus der MICER-Library von (Adams *et al.*, 2004) generiert. Die Generierung, Tierhaltung und Genotypisierung erfolgte im Wellcome Trust Sanger Institut. Die DNase-Seq- und Histonmarker-Daten stammen aus öffentlich zugänglichen Quellen (in Tabelle 20 angegeben).

Die Regulation von Genen in der Entwicklung von komplexen Organismen ist einem sehr komplizierten Prozess und verschiedenen Mechanismen unterworfen. Ein wesentlicher

Bestandteil hiervon sind cis-regulatorische nicht-kodierende DNA-Sequenzen, die durch die Interaktion mit zell- und entwicklungsspezifischen Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen steuern (Shlyueva *et al.*, 2014; Spitz and Furlong, 2012). Diese Enhancer können in Introns, überlappend mit Exons und auch in intergenischen Regionen lokalisiert sein und interagieren durch Schleifenbildung mit Promotoren aus bis zu einigen Megabasen Entfernung (Bulger and Groudine, 2011; Sagai *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob sich in der 1Mb- und 105Kb-KO Region trotz der Entfernung Enhancerelemente von *Bcl11b* befinden, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression dieses Gens im Thymus von gesunden Mäusen aus beiden Kohorten untersucht und mit der *Bcl11b*-Expression im Thymus von Kontrollmäusen ohne Deletion verglichen. Hierfür wurde aus dem in RNAlater eingefrorenem gesunden Thymus von 4 1Mb-KO Mäusen (heterozygot, n = 3; homozygot, n = 1), 10 105Kb-KO Mäusen (heterozygot, n = 4; homozygot, n = 6) und 5 Wildtyp-Mäusen als Kontrolle RNA isoliert. Mithilfe einer qRT-PCR wurde, wie im Methodenteil beschrieben, die Expression von *Bcl11b* in den Proben untersucht.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und homozygotem 105Kb- sowie heterozygotem 1Mb-KO (Abb. 5). Auch zeigten homozygote KO-Mäuse eine stärker reduzierte Expression als heterozygote KO-Mäuse. Der Unterschied zwischen Kontrolle und heterozygotem 105Kb-KO, sowie zwischen Kontrolle und homozygotem 1Mb-KO war aufgrund der niedrigen Probenzahl nicht signifikant (Abb. 5).

Diese Daten deuten darauf hin, dass es durch die Deletionen der intergenischen Region zu einer epigenetischen Dysregulation von *Bcl11b* kommt. Zudem zeigen sich allel- und größenspezifische Unterschiede zwischen den Mauskohorten: während bereits ein Knockout der regulatorischen Region auf einem Allel eine epigenetische Dysregulation von *Bcl11b* zur Folge hat, kommt es jeweils bei homozygotem Knockout zu einem stärkeren Abfall der *Bcl11b*-Expression. Auch zeigen 1Mb-KO Mäuse eine niedrigere Expression als 105Kb-KO Mäuse. Letzteres deutet darauf hin, dass die größere Deletion möglicherweise zusätzliche regulatorische Elemente von *Bcl11b* im Vergleich zur kleinen Deletion enthält.

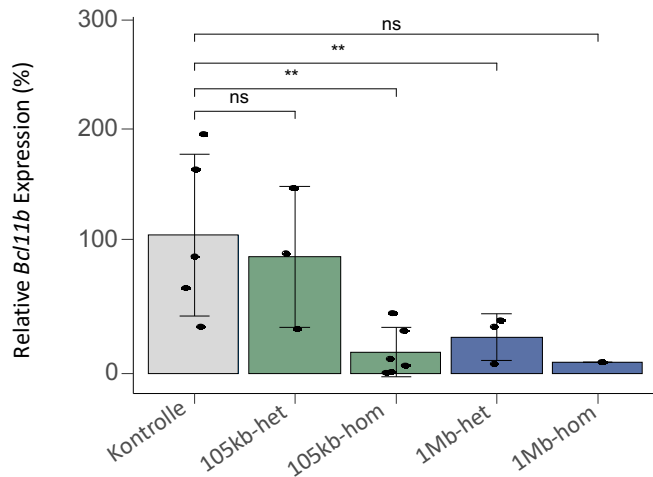


Abbildung 5 | Reduzierte Expression von *Bcl11b* in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

Analyse der Expression von *Bcl11b* in gesunden Thymi von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen relativ zu Kontrollmäusen ohne Deletion durch qRT-PCR. Die Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltgens *Gapdh* normalisiert. Kontrolle, Kontrollmäuse (n=5); 105Kb-het, heterozygote 105Kb-KO Mäuse (n=4); 105Kb-hom, homozygote 105Kb-KO Mäuse (n=6); 1Mb-het, heterozygote 1Mb-KO Mäuse (n=3); 1Mb-hom, homozygote 1Mb-KO Mäuse (n=1); ** $P \leq 0,05$, ns = nicht signifikant, zweiseitiger t-Test; Säulen = Mittelwert; Punkte = einzelne Proben; Fehlerbalken = Standardabweichung. Die Abbildung wurde aus (Fischer *et al.*, 2023) abgeändert.

9.4 Überleben der 105Kb- und 1Mb-KO Mäuse

In einer früheren Studie starben Mäuse mit einem homozygoten Knockout von *Bcl11b* bereits am ersten Tag nach der Geburt, während heterozygote Tiere keinen eindeutigen Phänotyp zeigten (Wakabayashi *et al.*, 2003b). Es wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die reduzierte Expression von *Bcl11b* in beiden KO-Kohorten einen Einfluss auf das Überleben hat. In der Studie wurden 50 1Mb-KO Mäuse (homozygot, n = 22; heterozygot, n = 28), 151 105 Kb-KO Tiere (homozygot, n = 98; heterozygot, n = 53) und 21 Wildtypmäuse als Kontrolle eingeschlossen.

Es zeigte sich, dass homozygote 1Mb-KO Mäuse signifikant kürzer als Kontrollmäuse ohne Deletion leben (Abb. 6). In beiden Kohorten überleben zudem homozygote Tiere signifikant kürzer als heterozygote Tiere. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollmäusen und heterozygoten 1Mb- sowie homo- und heterozygoten 105Kb-KO Mäusen. Es zeigen sich somit auch im Überleben allel- und größenspezifische Unterschiede des Knockouts. Inwiefern die epigenetische Dysregulation von *Bcl11b* die Differenz im Überleben beeinflusst und welcher Phänotyp hierfür ursächlich ist wurde in der weiteren Arbeit untersucht.

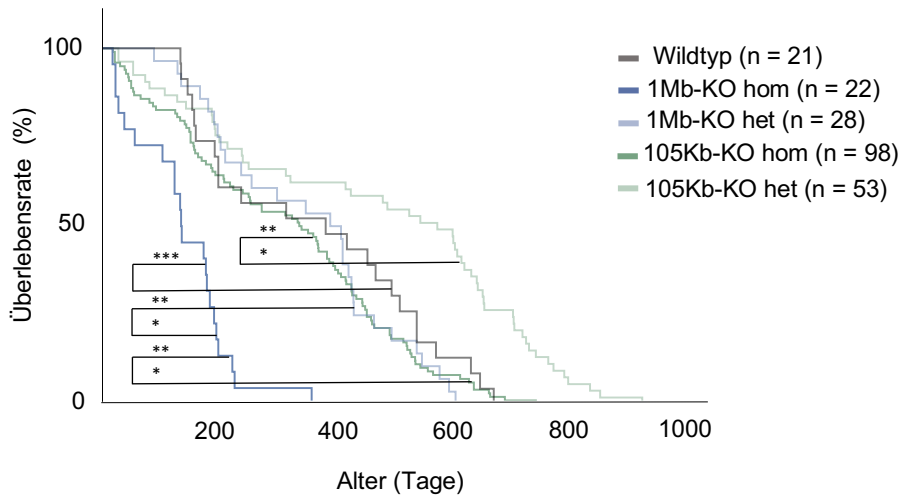


Abbildung 6 | Überleben von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

Überleben von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen. Kaplan-Meier Kurven, die das Überleben von homozygoten und heterozygoten 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen zeigen. Nur signifikante Unterschiede im Überleben sind dargestellt. *** $P < 0,0001$, Logrank-Test.

9.5 Tumorzinzidenz der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse

BCL11B wurde bereits als Tumorsuppressor beschrieben (Belver and Ferrando, 2016; Gutierrez et al., 2011; Neumann et al., 2015; Zhang et al., 2012). *BCL11B* ist in der T-ALL jeweils nur auf einem Allel inaktiviert (haploinsuffizient), sodass für den Tumor *BCL11B* möglicherweise eine sehr dosispezifische Rolle spielt (Gutierrez et al., 2011). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es bei 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-ALL zu einer Translokation von *TLX3* und *NKX2-5* in den intergenischen Bereich downstream von *BCL11B* (Asnafi et al., 2005; Ballerini et al., 2002; Bernard et al., 2001; Przybylski et al., 2006). Bisher wurde angenommen, dass es durch Überexpression beider Onkogene zur Entartung kommt (Belver and Ferrando, 2016). Welche Rolle die epigenetische Dysregulation von *BCL11B* hierbei spielt, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Um dieser Frage nachzugehen wurden Tiere aus beiden Kohorten insbesondere bezüglich der Entwicklung von Neoplasien überwacht. Ein großer Anteil der Mäuse bildete Tumoren aus: 105Kb-KO Mäuse entwickelten sowohl bei heterozygotem als auch bei homozygotem Knockout insbesondere hämatologische aber auch solide Neoplasien mit einer Inzidenz von ungefähr 25 % (Abb. 7). Während heterozygote 1Mb-KO Mäuse mit einer Inzidenz von 30% an hämatopoietischen und vereinzelt an soliden Tumoren erkrankten, entwickelten homozygote Tiere ausschließlich hämatologische Neoplasien, die sich insbesondere im Thymus manifestierten (Abb. 7).

Auch in der Tumorzinzidenz zeigen sich somit additive Effekte je nach Größe des Knockouts. Zudem gibt es auch insbesondere beim 1Mb-KO allelspezifische Unterschiede in der Tumorenpenetranz. Erstaunlicherweise beobachten wir in dieser Studie jedoch, dass bereits ein Knockout einer regulatorischen Region auf nur einem Allel zur Entstehung von Tumoren führen kann.

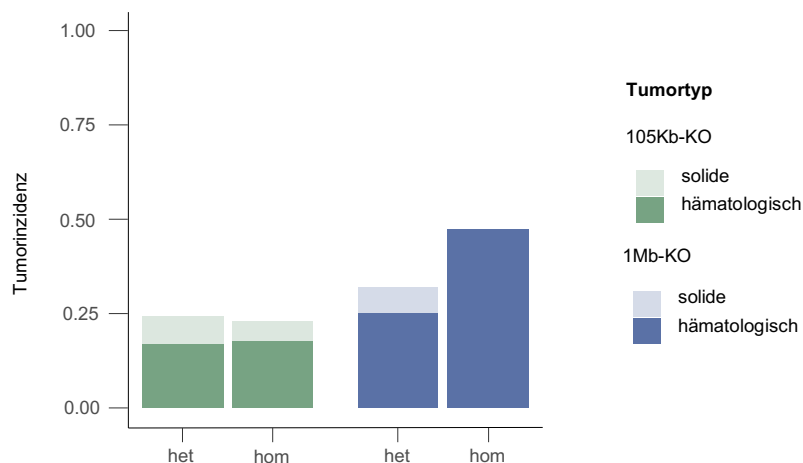


Abbildung 7 | Tumorzinzidenz bei 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

Inzidenz von soliden und hämatologischen Neoplasien in 105Kb- (n=34) und 1Mb-KO Mäusen (n=15). Het, heterozygot; hom, homozygot. Die Unterscheidung von hämatologischen und soliden Tumoren erfolgte makroskopisch am Wellcome Trust Sanger Institut und mikroskopisch in der Pathologie der Technischen Universität München durch Dr. med. vet. Katja Steiger. Die gesamte Abbildung wurde aus (Fischer *et al.*, 2023) abgeändert.

9.6 Tumorspektrum der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse

Genetische Abberationen von *BCL11B* und dessen downstream liegende intergenische Region wurden bisher insbesondere in der T-ALL beschrieben (Belver and Ferrando, 2016; Gutierrez *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012; Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001; Przybylski *et al.*, 2006). Die entstandenen soliden und hämatologischen Tumore wurden deshalb histologisch weiter subklassifiziert. Die makroskopische Analyse der Tumore sowie die Fixierung des Gewebes in Formalin, die anschließende Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von H&E-Schnitten erfolgte im Wellcome Trust Sanger Institut im Labor von Herrn Prof. Allan Bradley in Hinxton. Die Schnitte von hämatologischen Tumoren sowie die immunhistochemische Färbung gegen CD3, B220, CD4 und Tdt erfolgte in der Pathologie der Technischen Universität München.

Die histologische Subklassifizierung der soliden Tumore erfolgte durch Dr. med. vet. Katja Steiger in der Pathologie der Technischen Universität München. Bei dem 105Kb-KO ist der

Anteil an soliden Tumoren höher als beim 1Mb-KO und homozygote 1Mb-KO Mäuse entwickelten sogar ausschließlich hämatologische Tumore. Das solide Tumorspektrum beider Kohorten ist sehr gemischt: lediglich Dünndarm- und Gehirntumore sind in mehr als zwei Mäusen aufgetreten (Abb. 8a). Die H&E-Färbungen der soliden Tumore sind im Anhang abgebildet (Abb. 15).

Die Subklassifikation der hämatologischen Tumore erfolgte primär anhand der Morphologie (H&E-Färbung) und der immunhistochemischen Marker CD3 für T-Zellen und B220 für B-Zellen in der Pathologie der Technischen Universität München durch Frau Dr. med. vet. Katja Steiger und Frau Dr. med. vet. Hsi-Yu Yen nach den Bethesda-Richtlinien (Morse *et al.*, 2002). Es zeigte sich in der 105Kb-KO Kohorte in heterozygoten Tieren eine klare Tendenz in Richtung B-Zell-Lymphome, während homozygote Mäuse etwa gleich viele T-Zell- und B-Zell-Tumore entwickelten. Im Vergleich zum heterozygoten KO entstanden beim homozygoten 1Mb-KO fast ausschließlich T-Zell-Neoplasien.

Die T-Zell-Neoplasien wurden weiterhin durch immunhistochemische Marker bei entsprechender Morphologie (H&E-Färbung) weiter subklassifiziert (Abb. 8b). Bei Expression des murinen T-Zellmarkers CD3 und Tdt (Desoxyribonukleotidyltransferase, aktiv in der frühen T- und B-Zellentwicklung) wurden die Tumore entsprechend den Bethesda-Vorschlägen für die Klassifizierung von neoplastischen hämatopoietischen Tumoren der Maus als T-ALL/T-LBL kategorisiert (Morse *et al.*, 2002). Folgend wird T-ALL/T-LBL als T-ALL zusammengefasst. Außer einem kleinzelligen T-Zell-Lymphom (Tdt-negativ), handelte es sich bei allen T-Zell-Tumoren um T-ALL. Um zu untersuchen, ob es sich eher um ETP-ALL ähnliche Tumore handelt, wurde zusätzlich CD4 gefärbt, da dieser Phänotyp meist CD4-negativ ist (Haydu and Ferrando, 2013; Treanor *et al.*, 2014; Zuurbier *et al.*, 2014). Nur Proben mit mindestens mittelgradiger Positivität in mindestens 50% der Tumorzellen wurden als CD4-positiv gewertet. Nur eine homozygote 1Mb-KO Maus entwickelte eine Neoplasie mit sowohl CD4-positiven als auch -negativen Anteilen. Die anderen 17 T-ALL exprimierten immunhistochemisch kein CD4 und wurden als ETP-ähnlich bzw. Vorläufer-T-ALL klassifiziert.

1Mb- und 105Kb-KO Mäuse sind somit insbesondere für den Phänotyp der Vorläufer-T-ALL anfällig, der im Menschen eine sehr aggressive Unterform der T-ALL darstellt (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2017; Treanor *et al.*, 2014). Unsere Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den Beobachtung, dass genetische Aberration von *BCL11B* und dessen intergenischen Region insbesondere in der T-ALL auftreten und deuten darauf hin, dass die Translokationen von *TLX3* und *NKX2-5* zusätzlich durch epigenetische Dysregulation von *BCL11B* zur

Entstehung der T-ALL führen (Belver and Ferrando, 2016; Gutierrez et al., 2011; Neumann et al., 2015; Zhang et al., 2012; Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001; Przybylski *et al.*, 2006). Während homozygote 1Mb-KO Mäuse, die wie oben beschrieben die niedrigste *Bcl11b*-Expression zeigen, ausschließlich hämatologische und insbesondere T-ALL entwickeln, entstehen in heterozygoten 1 Mb- und homozygoten und heterozygoten 105Kb-KO Mäusen mit höherer *Bcl11b*-Expression auch solide und B-Zell-Tumore. Im heterozygoten 105Kb-KO, der mit der höchsten *Bcl11b*-Expression assoziiert ist, ist ausschließlich einer von 13 Tumoren von T-Zell-Ursprung.

Die Unterschiede der Inzidenz und des Tumorspektrums je nach Größe und Allelstatus des Knockouts deuten somit auf einen additiven und gewebsspezifischen Effekt der regulatorischen Elemente downstream von *Bcl11b* auf den Phänotypen der Mäuse hin.

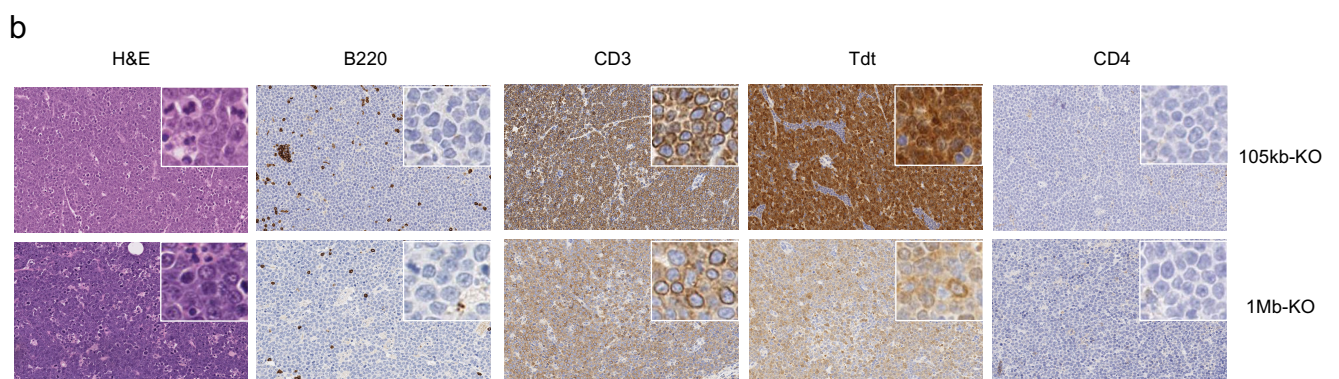
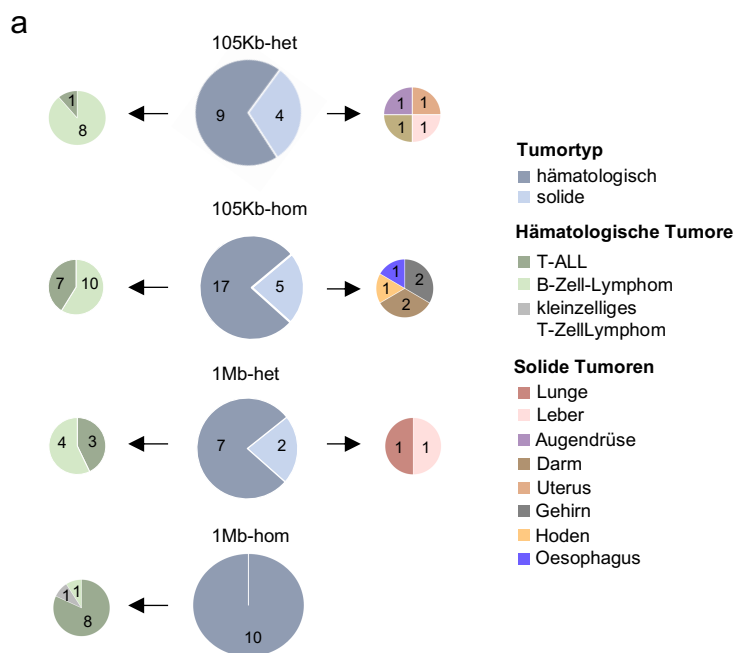


Abbildung 8 | Tumorspektrum und Histologie von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

a, Übersicht des Tumorspektrums in 1Mb-KO und 105Kb-KO Mäusen. Het, heterozygot; hom, homozygot. **b**, Immunhistochemische Klassifikation und Subcharakterisierung der hämatologischen Tumore (105Kb-KO, n=25 und 1Mb-KO, n=13). Tumore mit neoplastischen Zellen, die CD3 und Tdt exprimieren, wurden als T-ALL/T-LBL und solche mit B220-Expression als B-Zell-Lymphome charakterisiert. Die T-ALL, die in dieser Studie in beiden Kohorten entstanden sind, exprimierten kein CD4 und wurden deshalb als Vorläufer-T-ALL bezeichnet. Die Subcharakterisierung erfolgte in der Pathologie der Technischen Universität München durch Dr. med. vet. Katja Steiger und Dr. med. vet. Hsi-Yu Yen nach den Bethesda-Vorschlägen für die Klassifizierung von hämatologischen Tumoren der Maus (Morse *et al.*, 2002). Maßstableiste, 50µm; Vergrößerung der Bilder, 100x Vergrößerung. Die gesamte Abbildung wurde aus (Fischer *et al.*, 2023) abgeändert.

9.7 Reduzierte tumorspezifische Überlebensrate von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen

Um zu untersuchen, ob der Phänotyp der T-ALL die erniedrigte Überlebensrate bei homozygotem im Vergleich zu einem heterozygoten Knockout in beiden Kohorten erklären kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit das tumorspezifische Überleben analysiert.

In beiden Kohorten leben Mäuse mit T-Zell-Tumoren im Vergleich zu anderen Tumorgruppen im Durchschnitt kürzer: Tiere mit T-Zell-Neoplasien überleben etwa 250 (1Mb-KO) bis 300 (105Kb-KO) Tage (105Kb-KO), während Mäuse mit B-Zell und soliden Tumoren im Mittel zwischen 400 und 600 Tage alt werden (Abb. 9). Zudem sind insbesondere beim 105Kb-KO, aber auch beim 1Mb-KO, Mäuse mit homozygotem Knockout anfälliger für die Ausbildung einer T-ALL.

Dies deutet daraufhin, dass die Deletion der intergenischen Region vor *Bcl11b* bereits sehr früh als Tumortreiber zu einer leukämischen Entartung der T-Zellen führt. Aufgrund des längeren Überlebens der Mäuse mit B-Zell oder soliden Tumoren, könnten demnach bei diesen Neoplasien noch zusätzliche genetische Abberationen für eine Entartung notwendig sein.

Die allel- und kohortenspezifischen Unterschiede in der Überlebensrate könnten somit durch die Tumorpenetranz und Entwicklung einer Vorläufer-T-ALL erklärt werden.

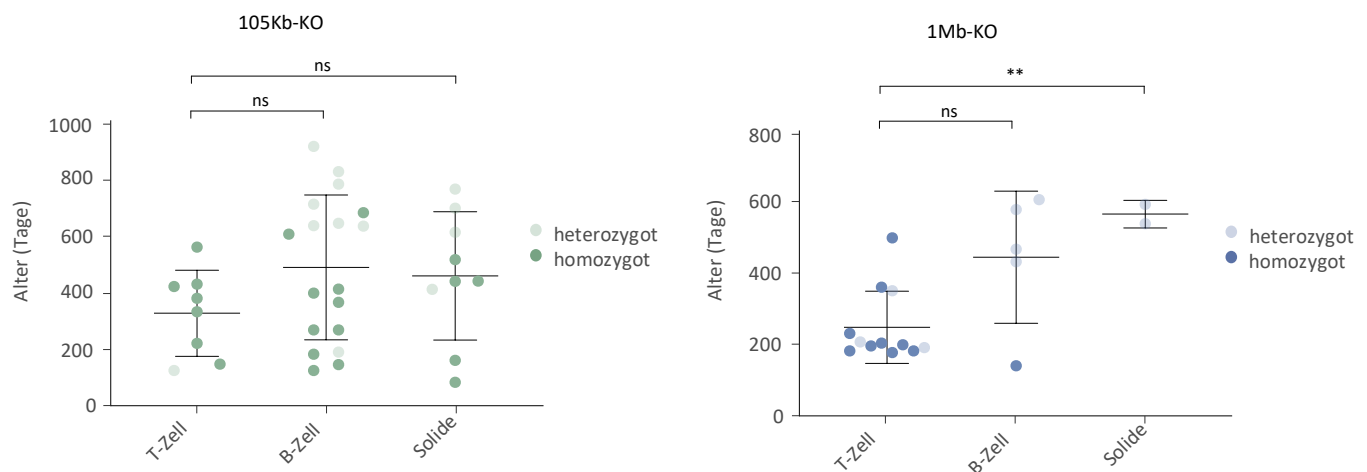


Abbildung 9 | Tumorspezifisches Überleben von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

Tumorspezifische Überlebensrate in beiden Kohorten. 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse mit T-Zell-Tumoren zeigen im Vergleich zu B-Zell- und soliden Neoplasien eine eingeschränkte Überlebenszeit von etwa 250 Tagen. In beiden Kohorten sind Tiere mit homozygoter Deletion anfälliger für T-Zell-Tumore und zeigen unabhängig vom Genotyp ein reduziertes Überleben. ** $P \leq 0,05$, ns = nicht signifikant, zweiseitiger T-Test; Mittelwert mit Punkten für die einzelnen Tumore in beiden Kohorten; Fehlerbalken = Standardabweichung. Die gesamte Abbildung wurde aus (Fischer *et al.*, 2023) abgeändert.

9.8 Genetische Aberrationen der T-ALL in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, entwickeln 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse durch die Deletion downstream von *Bcl11b* bereits früh eine ETP-ähnliche T-ALL. Um zu sehen, ob noch weitere genetische Aberrationen vorliegen, die zur Entwicklung der T-ALL geführt haben, wurden Kopienzahlvariationen auf DNA-Ebene von 10 T-ALL-Tumoren aus beiden Kohorten (1Mb-KO, n=4; 105Kb-KO, n=6) analysiert. Die Whole-Genome-Sequenzierung sowie die Auswertung der Daten erfolgten im Rahmen dieser Doktorarbeit. Das Mapping der Reads und das Prozessieren der Daten wurden durch den Bioinformatiker unseres Labors Thomas Engleitner durchgeführt.

Bei 6 von 10 Mäusen zeigte sich eine Amplifikation des gesamten Chromosoms 15 (Abb. 10). Auf diesem Chromosom liegen in der Maus die in der T-ALL bekannten Onkogene *Myc* und *Il7r*. *MYC* ist in der T-ALL häufig überexprimiert, insbesondere bei *NOTCH1*-Mutationen (Belver and Ferrando, 2016; Lange et al., 1992; Sanchez-Martin and Ferrando, 2017). *IL7R* wird durch eine Mutation bei 10% der T-ALL verstärkt aktiviert (Belver and Ferrando, 2016; Shochat et al., 2011; Zenatti et al., 2011). Hauptsächlich im aggressiven Subtyp der ETP-ALL und speziell in Therapie-resistenten Tumoren werden letztere Mutationen beschrieben (Kim et al., 2020; Oliveira et al., 2019; Zhang *et al.*, 2012). In $p19^{Arf^{-/-}}$ -Mäusen reicht diese Mutation bereits aus, damit die Tiere eine T-Zell Vorläufer lymphoblastische Leukämie entwickeln (Treanor *et al.*, 2014). Interessanterweise steht die Aktivierung von *Il7r* außerdem mit einer erniedrigten oder fehlenden Expression von *Bcl11b* in Zusammenhang (Treanor *et al.*, 2014). Daneben fielen rezidivierende Deletionen auf Chromosom 14 (9/10 Mäusen) und auf Chromosom 6 (8/10) auf. Auf Chromosom 6 befinden sich Gene für die β -Kette und auf Chromosom 14 für die alpha-Kette des T-Zellrezeptors in der Maus (Kranz et al., 1985), die schon früh während der T-Zellentwicklung umgelagert werden (Rothenberg, 2019). Dies bestätigt den T-Zell-Ursprung der T-ALL-Tumore, der bereits histologisch analysiert wurde. Tumore ohne diese Translokationen sind vermutlich bereits in einem früheren Stadium der Entwicklung, noch vor der Umlagerung des T-Zellrezeptors, entartet.

Die Kopienzahlanalysen der Leukämien des 1Mb- und 105Kb-KO steht somit in Einklang mit dem Subtyp der Vorläufer-T-ALL.

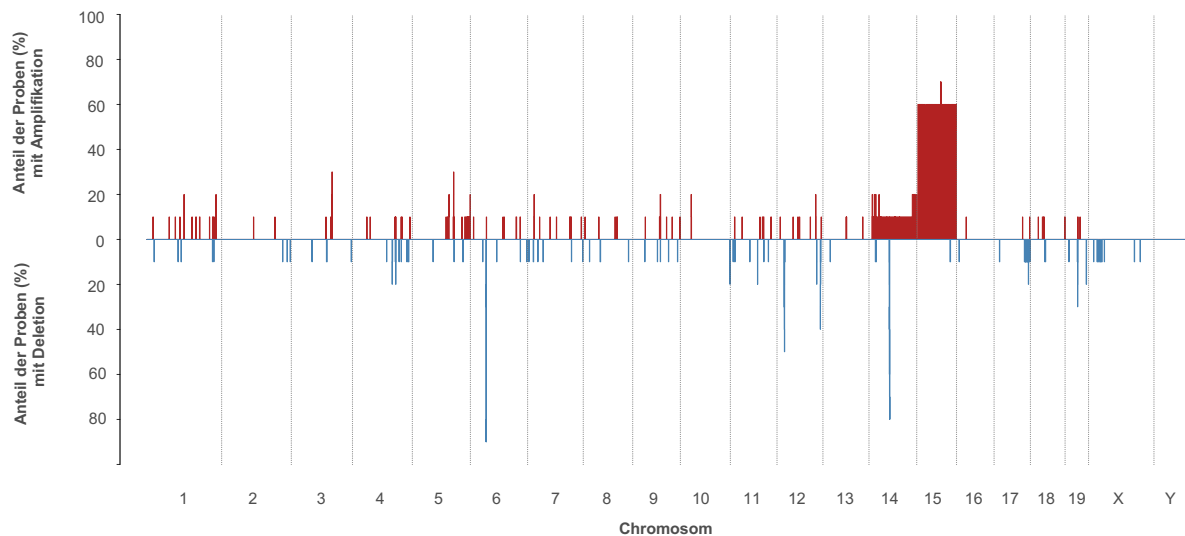


Abbildung 10 | Kopienzahlvariation (CNV) in den T-ALL der 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen.

Overlay Plot der CNV aus genomweiten Sequenzierdaten der T-ALL aus beiden Kohorten (1Mb-KO, n=4; 105Kb-KO, n=6). In Rot sind Amplifikationen und in Blau Deletionen dargestellt. Auf Chromosom 6 befinden sich Gene für die β -Kette und auf Chromosom 14 für die alpha Untereinheit des T-Zellrezeptors in der Maus (Kranz *et al.*, 1985). Der hohe Anteil an Deletionen auf beiden Chromosomen spiegelt den T-Zell-Ursprung der Tumore wider. Auf Chromosom 15 ist in vielen Proben eine Amplifikation von Chromosom 15 erkennbar. Es wurde ein Cut-off Wert des \log_2 -Verhältnisses von 0,3 gewählt und Werte zwischen -0,3 und 0,3 wurden als Kopienzahl-neutral gewertet. Das Mapping der Reads sowie das Prozessieren der Daten erfolgte durch den Bioinformatiker unseres Labors Thomas Engleitner.

9.9 MYC-Genexpressionssignatur in den T-ALL der 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse

Bei 24 Mäusen, die T-ALL entwickelten, wurde RNA aus in RNAlater eingefrorenem Tumorgewebe isoliert und sequenziert. Als Kontrolle wurde aus in RNAlater eingefrorenem gesunden Thymusgewebe von Wildtyp-Mäusen RNA isoliert. Die Cluster-Analysen sowie die Analysen der differentiell exprimierten Gene wurden wie im Methodenteil beschrieben durch Thomas Engleitner und Anja Fischer durchgeführt. Die Sequenzierung sowie die Interpretation der Daten erfolgten im Rahmen dieser Doktorarbeit.

Initiale Cluster-Analysen wurden wie in Müller *et al.* beschrieben mit 10% der Gene mit der höchsten Expressions-Variabilität durchgeführt (Mueller *et al.*, 2018). Hier zeigte sich, dass die T-ALL Tumore aus beiden Kohorten erwartungsgemäß zusammen gruppieren und eine hohe Varianz zu B-Zell-Tumoren aufweisen (Abb. 11a). Lediglich eine T-Zell-Probe unterschied sich deutlich von den anderen. Dies könnte durch Kontamination mit B-Zellen zu erklären sein, da dieser Tumor sich nicht im Thymus, sondern im Lymphknoten manifestiert hat. Die

Kontrollen clusterten aufgrund der molekularen T-Zell-Signatur im Thymus nahe der T-Zell-Leukämien.

Weiterhin wurden die differentiell exprimierte Gene zwischen den T-Zell-Leukämien aus dem 1Mb- und 105Kb-KO und den Kontrollen mit DESeq2 analysiert (Love *et al.*, 2014) (Abb. 11b). Diese differentiell exprimierte Gene wurden daraufhin mit der „Molecular Signature Database“ (MSigDB) v7.2 Gen-Set-Anreicherungsanalysen (GSEA) unterzogen. Es zeigte sich unter anderem eine verstärkte Aktivierung von Myc-Zielgenen (Abb. 11b und c). Cluster-Analysen mit Myc-Zielgenen aus dem Hallmark-Gen-Set von Liberzon *et al.* zeigten eine Gruppierung der T-ALL-Tumore aus beiden Kohorten weg von den Kontrollen, mit einer Anreicherung von Myc-Zielgenen (Abb. 11c) (Liberzon *et al.*, 2015). Dies steht in Einklang damit, dass 65% der humanen T-Zell-Leukämien eine aktivierende Mutation von *NOTCH1* aufweisen und die Überexpression dieses Onkogens von der Hochregulierung von *MYC* abhängig ist (Sanchez-Martin and Ferrando, 2017). Zudem deckt sich diese Beobachtung mit den in 9.7 beschriebenen Amplifikationen von Chromosom 15 bei 6 von 10 Mäusen mit T-ALL.

Auch Gene des mTOR-Signalwegs waren in den T-ALL-Proben im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt exprimiert (Abb. 11b). Dieser Signalweg wurde bereits häufig in der humanen T-ALL beschrieben und frühere Studien deuten darauf hin, dass insbesondere auch kindliche ETP-ALL eine verstärkte Aktivierung des mTOR-Signalwegs aufweisen (Serafin *et al.*, 2017). In Kontrast hierzu waren Gene, die in der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielen, im Vergleich zu den Kontrollen herunterreguliert (Abb. 11b): Gene aus dem Tnf- α Signalweg und der Interferon- α und - γ Antwort.

Zum weiteren Vergleich der T-ALL-Tumore aus der 1Mb- und 105Kb-KO Kohorte wurde zusätzlich RNA aus Tumorgewebe aus FFPE-Schnitten von insgesamt 16 Mäusen (1Mb-KO, n = 11; 105Kb-KO, n = 5), wie im Methodenteil beschrieben, isoliert und sequenziert. Hier zeigte sich, dass die T-ALL, die in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen entstanden sind, sehr homogen sind und vom Transkriptom eine geringe Streuung der Proben zeigen (Abb. 11d). Dies verdeutlicht, dass sich die molekulare Gensignatur der T-ALL-Tumore aus beiden Kohorten wenig unterscheidet. Demnach wäre die erhöhte Tumorgenetrische Penetranz je nach Allelstatus und Größe des Knockouts einem additiven Effekt der cis-regulatorischen Elemente in der epigenetischen Dysregulation desselben Gens *Bcl11b* geschuldet.

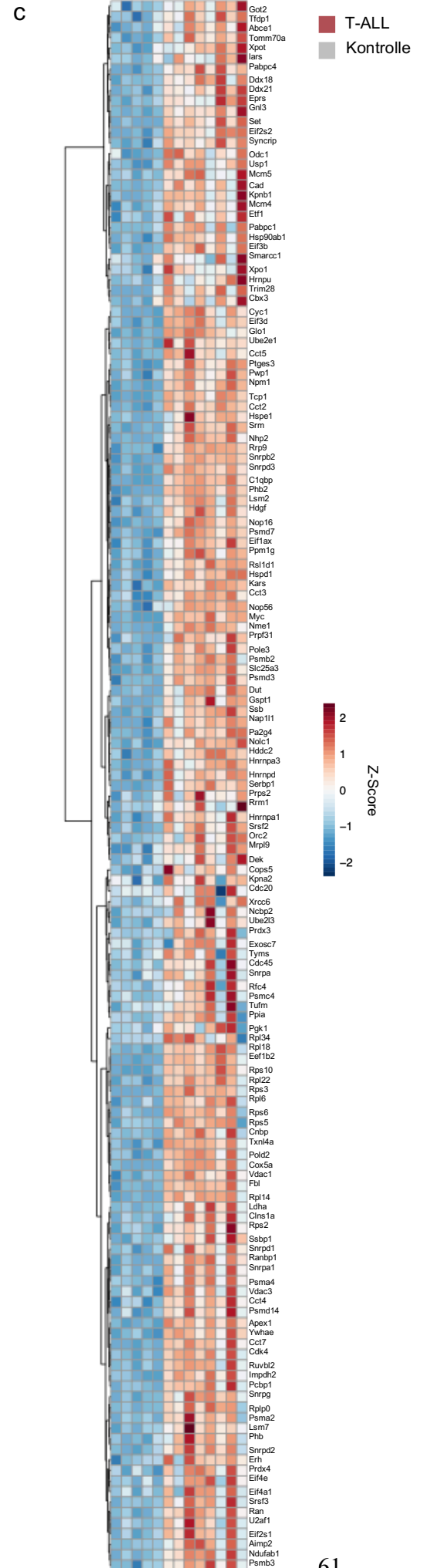
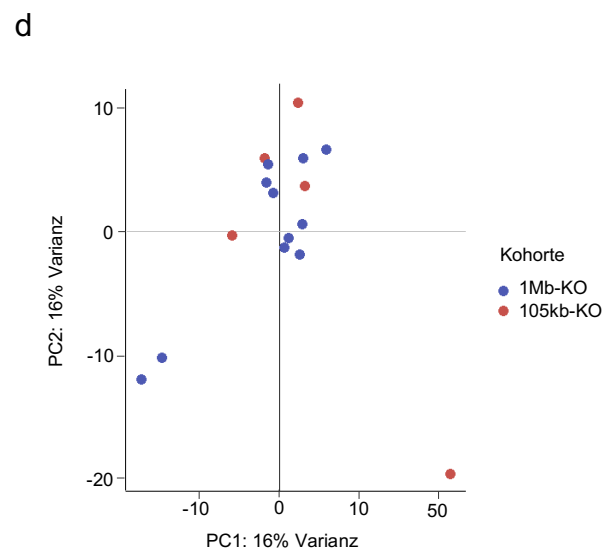
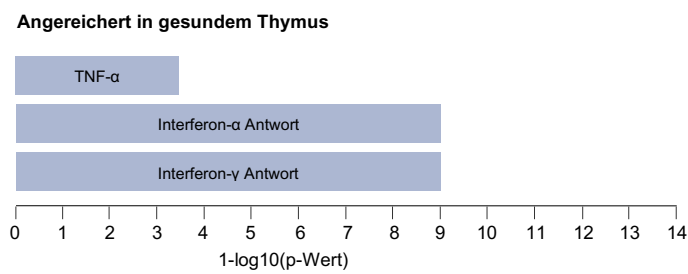
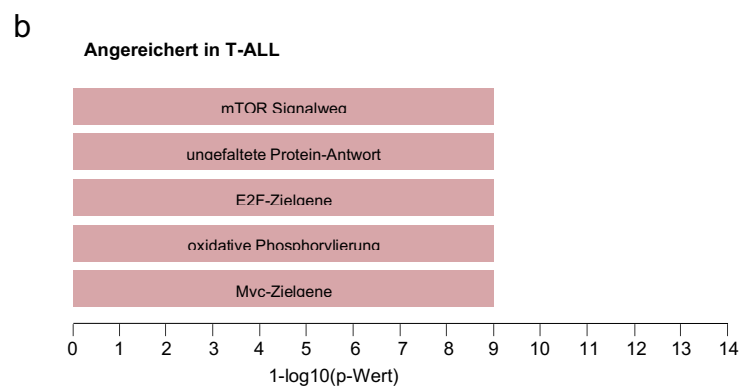
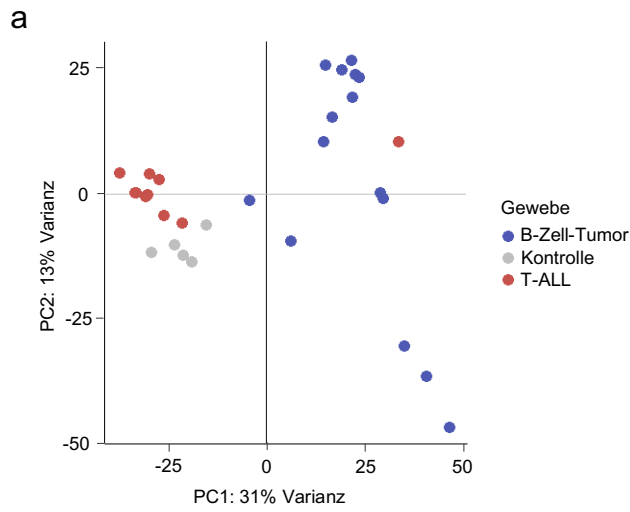


Abbildung 11 | Genexpressionsanalysen der T-ALL in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen

a, Hauptkomponentenanalyse der RNA-Sequenzierdaten von Gewebe von hämatologischen Tumoren aus beiden Mauskohorten (n=24) und von Kontrollthymus von gesunden Mäusen (n=5). T-Zell-Tumore beider Kohorten clustern nahe den Kontrollen und zeigen eine hohe Varianz zu B-Zell-Tumoren. **b**, Auszug aus Gen-Set-Anreicherungsanalysen der differentiell regulierten Gene zwischen den T-ALL aus beiden Kohorten und den Kontrollen. Die Analysen wurden mit der „Molecular Signature Database“ (MSigDB) v6.0 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) und dem Hallmark-Gen-Set von (Liberzon *et al.*, 2015) durchgeführt. Die Analyse für differentiell exprimierte Gene zwischen den Clustern erfolgte mit DeSeq2 (Love *et al.*, 2014). **c**, Unvoreingenommene hierarchische Clusterbildung der Transkriptionsprofile der T-ALL aus beiden Kohorten und der Kontrollen auf Basis von Myc-Zielgenen aus dem Hallmark-Gen-Set von (Liberzon *et al.*, 2015). Die Kontrollen und die T-Zell-Leukämien bilden eigene Cluster. Die T-ALL-Tumore überexprimieren im Vergleich zu den Kontrollen Myc-Zielgene. **d**, Hauptkomponentenanalyse der RNA-Sequenzierdaten von FFPE-Gewebe der T-ALL aus beiden Mauskohorten (n=16). Die T-Zell-Leukämien von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen zeigen vom Transkriptom eine geringe Streuung. **a-d**, Die bioinformatischen Analysen wurden durch Thomas Engleitner und Anja Fischer durchgeführt.

9.10 Fehlende Expression von *ThymoD* in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen

In einer früheren Publikation wurde eine nicht-kodierende RNA (*ThymoD*) beschrieben, die downstream von *Bcl11b* liegt und dessen fehlende Expression zu der Entwicklung von T Zell Tumoren führt (Isoda *et al.*, 2017a). Der 105Kb-KO liegt wenige Kilobasen upstream von *ThymoD* und die homologe Sequenz des MHPN MICER-Zielvektors überlappt mit der Sequenz dieser lncRNA (Abb. 12). Um zu untersuchen, ob beide Knockouts die Expression der lncRNA beeinflussen oder *ThymoD* den Unterschied der Tumorgenetranz zwischen beiden Kohorten erklären kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen Expression in Mäusen aus beiden Kohorten analysiert.

Hierfür wurde aus den in RNAlater eingefrorenen gesunden Thymi von vier 1Mb-KO Mäusen (heterozygot, n = 3; homozygot, n = 1), sieben 105Kb-KO Mäusen (heterozygot, n = 3; homozygot, n = 4) und fünf Wildtypmäusen als Kontrolle RNA isoliert. Mithilfe einer qRT-PCR wurde, wie im Methodenteil beschrieben, die Expression von *ThymoD* in den Proben untersucht.

Sowohl homozygote 1Mb- als auch homozygote 105Kb-KO Mäuse wiesen keine Expression von *ThymoD* im Thymus auf (Abb. 12). Zudem zeigten Tiere mit nur einem deletierten Allel eine Expression auf, die im Mittelwert nur bei 25% (105Kb-KO) und 32% (1Mb-KO) der Expression von Kontrollmäusen lag.

Somit war *ThymoD* in beiden Kohorten je nach Allelstatus nicht oder gering exprimiert. Unsere Daten deuten darauf hin, dass der Unterschied in der Tumorgenetranz und im Phänotyp unabhängig von der lncRNA ist.

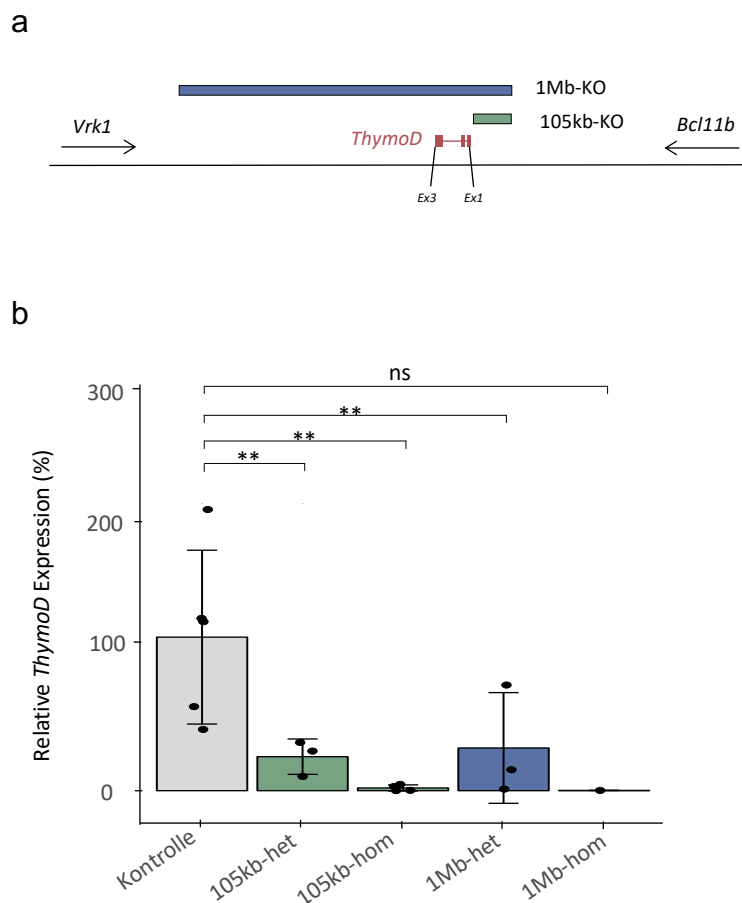


Abbildung 12 | Expression der lncRNA *ThymoD* in 1Mb-KO- und 105Kb-KO Mäusen.

a, Lokalisation der lncRNA *ThymoD* downstream von *Bcl11b*. **b**, Analyse der Expression von *ThymoD* in 1Mb-KO Mäusen (heterozygot, n=3 und homozygot, n=1) und 105Kb-KO Mäusen (heterozygot, n=3 und homozygot, n=4) relativ zu Kontrollmäusen ohne Deletion (n=5) durch qRT-PCR. Die Expression der nichtkodierenden RNA wurde auf die Expression des Haushaltgens *Gapdh* normalisiert. Kontrolle, Kontrollmäuse; ** $P \leq 0,05$, ns = nicht signifikant, zweiseitiger T-Test; Säulen = Mittelwert; Punkte = einzelne Proben; Fehlerbalken = Standardabweichung.

9.11 Strukturelle und funktionelle Analyse eines potentiellen neuen Enhancers von *Bcl11b*

Aktive Enhancer sind insbesondere durch folgende Merkmale gekennzeichnet: (i) die Histonmarker H3K4me1 und H3K27ac, (ii) offenes Chromatin (DNase-Seq oder ATAC-Seq) und (iii) die Bindung von Zell- und Kontextspezifischen Transkriptionsfaktoren (Shlyueva *et al.*, 2014). Um weitere Enhancer von *Bcl11b* in der 1Mb-KO Region zu finden, die den Unterschied in der T-ALL Inzidenz zu 105Kb-KO Mäusen erklären könnten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene epigenetische Marker in dieser Region analysiert.

Da *Bcl11b* insbesondere in der Entwicklung der T-Zellen stark exprimiert ist, wurden öffentlich zugängliche Daten aus verschiedenen Stadien dieser Entwicklung verwendet (Hu *et al.*, 2018). Neben H3K4me1, H3K27ac und offenem Chromatin wurden auch ChIP-Seq Daten von für die

T-Zelldifferenzierung (Tcf1, Bcl11b, Runx1 und Satb1) und Schleifenbildung zwischen Enhancern und Promotoren (CTCF) wichtigen Transkriptionsfaktoren untersucht (Hu *et al.*, 2018). Zusätzlich zu einem bereits beschriebenen Superenhancer (Li *et al.*, 2013), der auch die lncRNA *ThymoD* enthält (Isoda *et al.*, 2017b), zeigten sich weitere Regionen in diesem intergenischen Lokus mit einer starken Überlappung mit allen oben genannten epigenetischen Markern und eine Interaktion zu *Bcl11b* (HiC) in der späten T-Zellentwicklung (Abb. 13). Hierbei fiel insbesondere eine Region auf, die auch ein Insertionshotspot im T-ALL-Transposon-Screen darstellt und in Abbildung 13 markiert wurde (Fischer *et al.*, 2023).

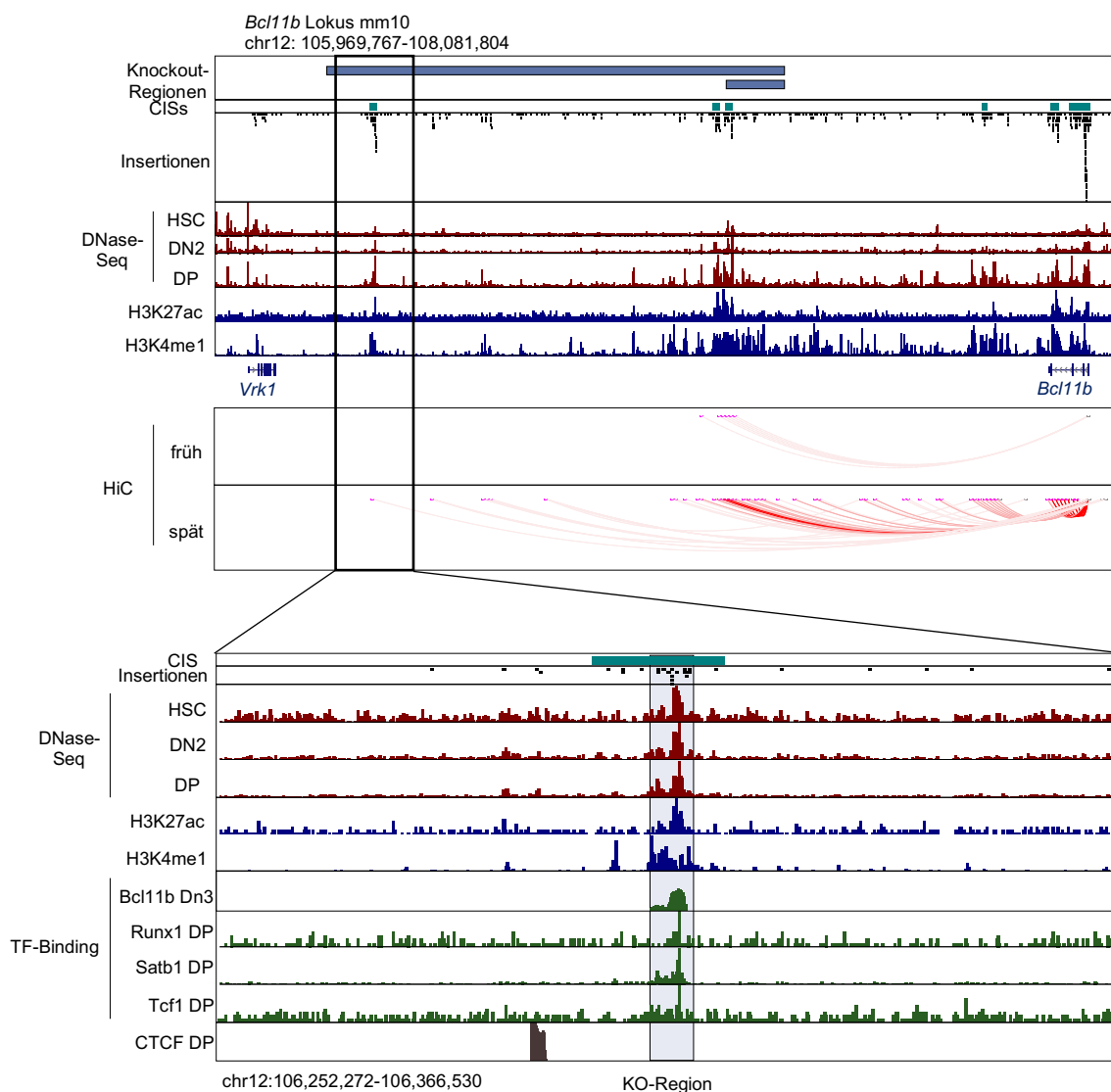


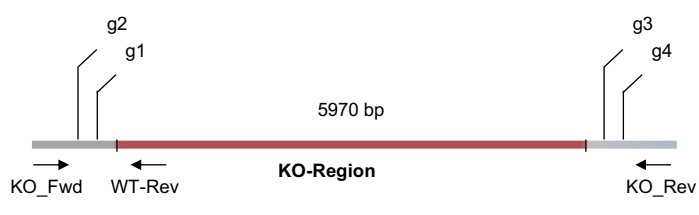
Abbildung 13 | Identifikation eines unbeschriebenen potentiellen Enhancers in der 1Mb-KO-Region durch epigenetische Marker.

Intergenische Region downstream von *Bcl11b*. Ein Locus (durch Rahmen markiert) zeigt eine Überlappung mit Enhancer-Markern (H3K4me1, H3K27ac und offenes Chromatin), mit einem CIS in dem T-ALL-Transposon-Screen und Wechselwirkungen (Hi-C) mit der Promotorregion von *Bcl11b* in der späten T-Zellentwicklung (DN2b-DP). Unterhalb ist eine Vergrößerung dieses Enhancers dargestellt. Für die T-Zellentwicklung wichtige Transkriptionsfaktoren (*Bcl11b*, *Tcf1*, *Satb1* und *Runx1*) binden den Enhancer in doppelt-negativen T-Zellentwicklungsstadien. Downstream von dieser Region bindet der für die Chromatinschleifenbildung wesentliche Transkriptionsfaktor CTCF. Der markierte Bereich wurde in murinen T-Zellen ausgeknockt. Die Hi-C-, DNase-Seq-, Chip-Seq- und Histonmarker-Daten stammen von öffentlich zugänglichen Quellen (in Tabelle 20 angegeben). Insertionsdaten und CIS stammen aus (Fischer *et al.*, 2023).

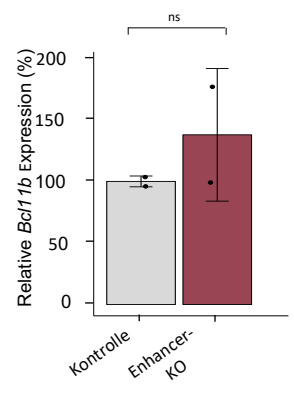
Um die Dyregulation von *Bcl11b* und deren Auswirkung auf die Leukämieentstehung besser zu verstehen, ist es das Ziel weitere potentielle Enhancerelemente von *Bcl11b* funktionell zu validieren. Diese Studie beschränkt sich zunächst auf die in Abbildung 13 umrahmte Region. Hierfür wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Locus in der murinen T-Zell-Lymphom Zelllinie EL4 CRISPR/Cas9-basiert deletiert. Anhand der Ausdehnung der epigenetischen Marker wurde eine Region von 5970 Basenpaaren für den Knockout gewählt (Abb. 13). Auf beiden Seiten des Enhancers wurden jeweils zwei Guides designed (Abb. 14a). Der genaue Ablauf für das Einfügen der Deletion wird im Methodenteil beschrieben und ist in Abbildung 14b gezeigt. Um zu validieren, dass die potentielle regulatorische Region ausgeknockt wurde, wurde eine PCR durchgeführt mit Primern, die die knockout Region flankieren. Drei Klone zeigten eine Knockout-Bande in der Gelelektrophorese und einer dieser Klone (Klon 20) auch ein Fehlen der Wildtyp-Bande (Abb. 14c). Bei zwei von den drei Klonen bestätigte sich durch Sanger-Sequenzierung des Produktes der Knockout-PCR eine Deletion des Enhancers (Abb. 14d). Die anschließende Expressionsanalyse von *Bcl11b* in beiden Klonen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu Kontrollzellen ohne Knockout.

Der fehlende Effekt des Knockouts auf die Expression von *Bcl11b* könnte verschiedene Gründe haben: einerseits könnte die EL4-Zelllinie als Tumorzelllinie möglicherweise das falsche Zellsystem darstellen. Auch aktivieren Enhancer in bestimmten Entwicklungsstadien wichtige Entwicklungsgene und der Enhancer könnte in der EL4-Zelllinie zur Aufrechterhaltung der *Bcl11b*-Expression bereits entbehrlich sein (Long *et al.*, 2016; Shlyueva *et al.*, 2014; Spitz and Furlong, 2012). Außerdem könnte der Knockout eines einzelnen Enhancers einer über 1 Megabasen großen regulatorischen Region für die epigenetische Dysregulation von *Bcl11b* nicht ausreichend sein oder durch andere regulatorische Mechanismen kompensiert werden. Die möglichen Gründe wurden umfassend in der Diskussion herausgearbeitet. Um einen Effekt dieses identifizierten potentiellen regulatorischen Elements zu bestätigen oder zu widerlegen, bedarf es jedoch weiterer funktioneller Experimente.

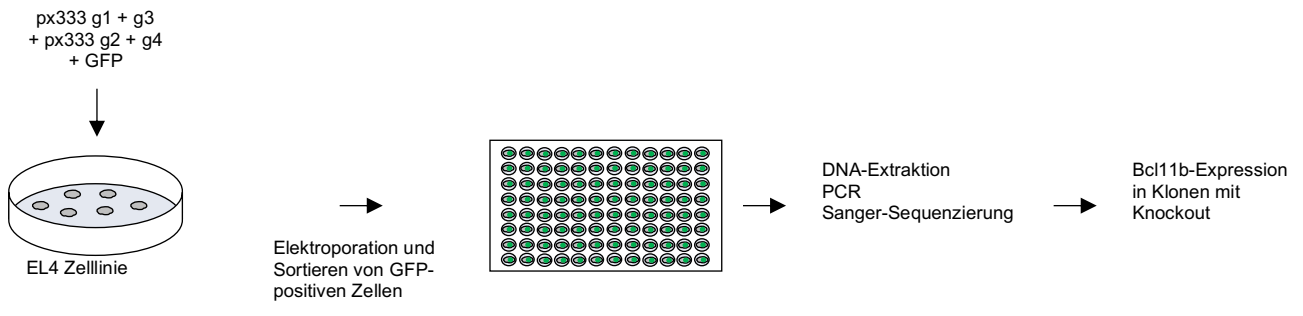
a



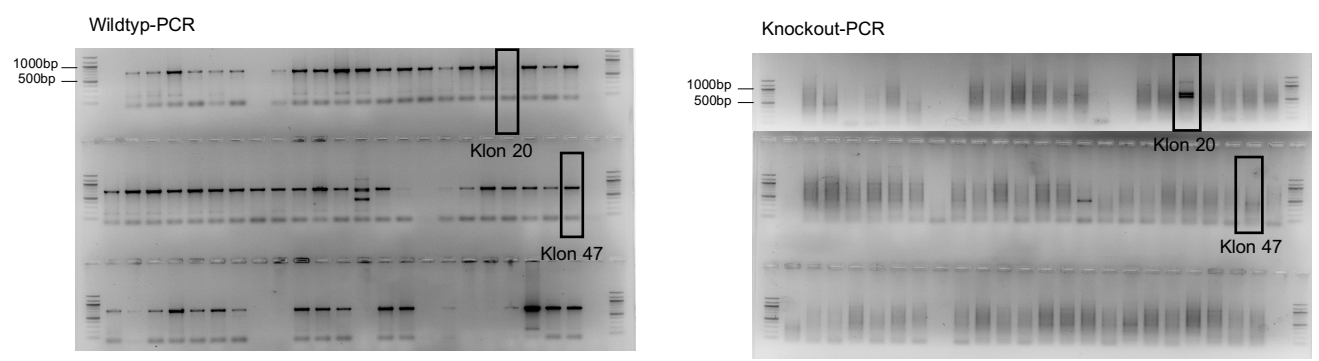
e



b



c



d

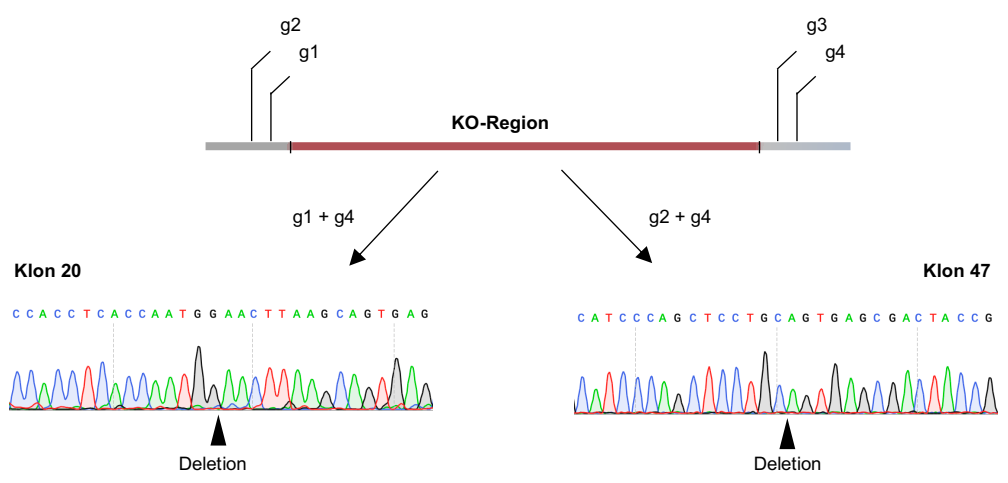


Abbildung 14 | CRISPR/Cas9-basierter Knockout des Enhancers in murinen T-Zellen.

a, Guide-Design und Genotypisierungsprimer für den Knockout des Enhancers in der murinen T-Zell-Lymphom Zelllinie EL4. **b**, Workflow für den CRISPR/Cas9 Knockout des Enhancers *in vitro*. Der px333-Vektor von Addgene wurde so kloniert, dass er jeweils 2 sgRNAs und das Enzym Cas9 exprimiert. EL4-Zellen wurden daraufhin mit beiden Vektoren und einem GFP-Plasmid durch Elektroporation transfiziert. **c**, Gelbilder der Genotypisierung von Einzelzellklonen mit einem Knockout des Enhancers. Die umrahmten Banden sind von Zellklonen, die eine Deletion des Enhancer zeigten, die durch Sanger-Sequenzierung validiert werden konnte. Klon 20 hatte eine Deletion auf beiden Allelen, weil keine Wildtyp-Bande (700 bp) aber eine Knockout-Bande (700 bp) zu sehen ist, während Klon 47 aufgrund der Wildtyp-Bande den Knockout nur auf einem Allel zeigte. **d**, Sanger-Sequenzierungsspuren beider Zellklone. Bei Klon 20 ist die Deletion zwischen der Bindungsstelle von den sgRNAs 1 und 4 und beim Klon 47 den sgRNAs 2 und 4. **e**, Analyse der Expression von *Bcl11b* in den Knockout-Klonen (n = 2) und in den Kontrollen ohne Knockout (n = 2) durch qRT-PCR. Die Expression von *Bcl11b* wurde auf die Expression des Haushaltsgens *Gapdh* normalisiert. ns = nicht signifikant, zweiseitiger T-Test; Säulen = Mittelwert; Punkte = einzelne Proben; Fehlerbalken = Standardabweichung.

10. Diskussion

10.1 *Bcl11b*-Dosis in der Evolution von hämatologischen Tumoren

Bcl11b wurde bereits mehrfach als Tumorsuppressor beschrieben, der in bis zu 10% aller T-ALL mutiert ist (Belver and Ferrando, 2016; Gutierrez *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Interessanterweise erfolgt die Inaktivierung nur auf einem Allel und das verbleibende Wildtyp-Allel gibt den Leukämiezellen einen gewissen Selektionsvorteil (Gutierrez *et al.*, 2011; Kamimura *et al.*, 2007). Außerdem sterben Mäuse mit homozygotem Knockout des Gens bereits in den ersten Lebenstagen (Wakabayashi *et al.*, 2003b).

In dieser Studie beobachten wir, dass der Knockout von zwei verschiedenen großen Regionen downstream von *Bcl11b* Tumore induziert. Es zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied im Phänotyp zwischen beiden Kohorten. So entwickelten Mäuse mit einem homozygoten 1Mb-KO fast ausschließlich T-ALL, während in heterozygoten 105Kb-KO Tieren lediglich solide Tumore und B-Zell-Lymphome entstanden sind. Gleichzeitig beobachten wir, dass sowohl die Größe des Knockouts als auch der Allelstatus sich in der Expression des Gens *Bcl11b* widerspiegelt. Selbst in 1Mb-KO Mäusen ist noch eine Restexpression von *Bcl11b* vorhanden, sodass die Mäuse alt genug werden, um T-Zell-Tumore zu entwickeln (Wakabayashi *et al.*, 2003b).

Die T-ALL aus beiden Kohorten zeigen keine Expression von CD4 und wurden deshalb als Vorläufer-T-ALL klassifiziert, die im Menschen am ehesten das Korrelat der ETP-ALL darstellt (Haydu and Ferrando, 2013; Treanor *et al.*, 2014; Zuurbier *et al.*, 2014). Somit entarten T-Zellen in 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen bereits in den frühen Stadien der Entwicklung. Wie oben beschrieben ist *Bcl11b* ein Schlüsselgen für den Übergang aus dem DN2- in das DN3- und später in das DP-Stadium (Ikawa *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2010b). Dementsprechend könnte der Phänotyp der Vorläufer-T-ALL in den Mauskohorten durch eine Blockade in der T-Zellentwicklung hervorgerufen werden, die durch die erniedrigte Expression von *Bcl11b* zu erklären wäre. Auch humane Sequenzierstudien zeigen in ETP-ALL eine erniedrigte Expression von *BCL11B* (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2017; Treanor *et al.*, 2014).

Wie bereits in früheren Studien in anderen Organsystemen beschrieben (Gordon and Lyonnet, 2014), beobachten wir eine Modularität im Phänotyp der Mäuse durch einen additiven Effekt der Enhancerelemente downstream von *Bcl11b*: je nach Größe und Allelstatus des Knockouts der regulatorischen Region, entwickeln Mäuse ein unterschiedliches Tumorspektrum.

10.2 Unterschied in der T-ALL-Inzidenz von 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen ist unabhängig von *ThymoD*

In einer früheren Publikation wurde die nicht-kodierende RNA *ThymoD*, die downstream von *Bcl11b* gelegen ist, funktionell charakterisiert (Isoda *et al.*, 2017b). In dieser Studie wurde in das Genom von Mäusen eine Poly(A)-Kassette direkt upstream von *ThymoD* eingebaut, damit diese ncRNA nicht transkribiert wird. Die T-Zellen der *ThymoD* p(A)/p(A) Mäuse wiesen eine deutlich erniedrigte *Bcl11b*-Expression auf. Außerdem war die Entwicklung der T-Zellen gestört: während die Rate an DN1- und DN2-Zellen zunahm, kam es zu einer reduzierten Anzahl von DN3- und DN4-Zellen. Die Autoren konnten nachweisen, dass *ThymoD* die Expression von *Bcl11b* in den frühen Stadien der T-Zellentwicklung durch Chromatinschleifenbildung zwischen einem bereits publizierten Super-Enhancer und dem Promoter aktiviert (Li *et al.*, 2013).

In dieser Studie entwickelten 6 von 20 *ThymoD* p(A)/p(A) Mäuse Tumore (Isoda *et al.*, 2017b). Jeweils die Hälfte der Tumore waren T-Zell-Lymphome und die andere Hälfte T-Zell-Leukämien. Die Neoplasien wurden jedoch nicht weiter histologisch subcharakterisiert. Auch zeigten 3 von den 6 Tumoren trotz der Polyadenylierung ein Antisense-Transkript von *ThymoD* und eine erhöhte Expression von *Bcl11b*.

Der 105Kb-KO beginnt wenige Kilobasen upstream von *ThymoD* und es wurde deswegen in dieser Studie untersucht, ob diese ncRNA die unterschiedliche T-ALL-Inzidenz von 105Kb- und 1Mb-KO Mäusen erklären kann. Wie in den Ergebnissen dargestellt, war *ThymoD* jedoch in homozygoten Tieren beider Kohorten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht und bei heterozygotem KO nur gering exprimiert. Somit hebt auch die 105Kb-Deletion die Transkription der lncRNA *ThymoD* auf. Auch zeigten 1Mb-KO Mäuse einen anderen Phänotyp als *ThymoD* p(A)/p(A) Mäuse: (i) die Inzidenz von T-Zell-Neoplasien war mit 50% beim homozygoten 1Mb-KO höher als mit 30% bei *ThymoD*-Polyadenylierung und (ii) 1Mb-KO Mäuse entwickelten fast ausschließlich T-ALL und nur ein T-Zell-Lymphom. Außerdem waren die Tumore in *ThymoD* p(A)/p(A) Mäusen CD4- und CD8-positiv (Isoda *et al.*, 2017b). Dies spricht eher für eine reifere Form der Leukämie. Demgegenüber wurde in dieser Arbeit eine Negativität für CD4 in den T-ALL histologisch nachgewiesen. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass neben der ncRNA in unserer Studie auch Enhancerelemente deletiert wurden und die T-Zellen deshalb noch in früheren Phasen der T-Zellentwicklung entartet sind. In der Hälfte der Tumore aus der Studie von Isoda *et al.* könnte das Antisense-Transkript von *ThymoD* eine Entartung in späteren T-Zellentwicklungsstadien bedingt haben, da die Funktion sequenzunabhängig ist (Isoda *et al.*, 2017b).

Demzufolge kann *ThymoD* allein nicht den Unterschied in der T-ALL-Inzidenz zwischen 1Mb- und 105Kb-KO Mäusen erklären und es müssen im 1Mb-KO noch weitere regulatorische Elemente liegen. Die erniedrigte Expression von *Bcl11b* und die Entstehung von T-Zell-Neoplasien sind jedoch mit dieser Studie konform.

10.3 Strukturelle und funktionelle Validierung eines unbeschriebenen regulatorischen Elements von *Bcl11b*

Um den Unterschied in der Expression von *Bcl11b* zwischen beiden Kohorten trotz fehlender ThymoD-Expression zu erklären, haben wir die intergenische Region downstream von *Bcl11b* auf weitere funktionelle Elemente untersucht. Wir konnten mehrere Bereiche identifizieren, die folgende Charakteristika aufwiesen: (i) starke humane Syntänie, (ii) epigenetische Enhancer-Marker, (iii) Bindung von für die T-Zellentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktoren und (iv) eine Interaktion mit dem Promotor von *Bcl11b* während der T-Zellentwicklung. Ein Locus fiel hierbei besonders auf, der auch im PiggyBac-Mutagenesecscreen in der Kohorte der T-ALL-Tumore eine Anhäufung von Transposon-Insertionen aufwies, die statistisch nicht durch Zufall erklärbar ist (Fischer *et al.*, 2023). Deshalb wurde dieser Locus im Rahmen dieser Studie zuerst untersucht.

Der Knockout des Enhancers in einer T-Zelllymphom Zelllinie in der Maus (EL4) zeigte jedoch keinen Effekt. Dies könnte durch verschiedene Eigenschaften von Enhancern zu erklären sein. Erstens sind Enhancer nur in bestimmten Entwicklungsstadien aktiv und aktivieren wichtige Entwicklungsgene (Long *et al.*, 2016; Shlyueva *et al.*, 2014; Spitz and Furlong, 2012). Sobald die Zelle sich jedoch der Linie verpflichtet hat, kann die Funktion des Enhancers zur Aufrechterhaltung der Expression in einigen Fällen entbehrlich sein (Chong *et al.*, 2010). Zweitens werden Gene, die eine kritische Rolle in der Evolution spielen, häufig durch Super-Enhancer reguliert (Heinz *et al.*, 2015; Hnisz *et al.*, 2013; Pott and Lieb, 2015; Whyte *et al.*, 2013). Diese weisen insbesondere eine starke Bindung des Mediator-Komplex (Med1) und eine Akkumulation von H3K27ac auf (Hnisz *et al.*, 2013; Pott and Lieb, 2015). Es ist jedoch noch nicht definiert, ob Super-Enhancer ein zusammenhängendes Konstrukt oder eher ein Komplex von mehreren Enhancern sind (Pott and Lieb, 2015). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass einzelne Enhancer-Module eines Super-Enhancers zusammenwirken und der Ausfall einer Untereinheit durch die anderen Elemente oft kompensiert werden kann (Bahr *et al.*, 2018; Dukler *et al.*, 2016; Hay *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2016). Zudem könnte der Enhancer im 1Mb-KO noch als Shadow Enhancer fungieren. Hierbei handelt es sich um redundante Enhancer, die dieselbe Funktion wie ein anderer Enhancer wahrnehmen (Cannavo *et al.*, 2016; Hong *et al.*,

2008; Kvon et al., 2021). Der Knockout einer der beiden Enhancer kann ganz oder teilweise durch den anderen kompensiert werden und erst die Deletion von beiden cis-regulatorischen Elementen erzielt eine starke Reduktion der Genexpression (Cannavo *et al.*, 2016; Kvon *et al.*, 2021; Xiong et al., 2002).

Schließlich könnte es sich bei der EL4-Tumorzelllinie auch um das falsche Zellsystem gehandelt haben, da die Zellen bereits leukämisch entartet und pathophysiologische Zellprozesse bereits angeschaltet sind. *In vivo* Experimente oder Zellsysteme, die die physiologische Entwicklung von T-Zellen nachahmen (Redecke et al., 2013; Schmitt et al., 2004), könnten demnach geeignetere Medien darstellen.

Für die funktionelle Validierung des strukturell identifizierten Enhancerelements von *Bcl11b* sind deshalb noch Experimente notwendig. Zudem ist ein weiteres Ziel, die anderen potentiellen regulatorischen Bereiche in der über 1 Megabasen großen intergenischen Region downstream von *Bcl11b* funktionell zu validieren.

10.4 Epigenetische Dysregulation von *BCL11B* durch rezidivierende Translokationen in der humanen T-ALL

In 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-ALL kommt es zu einer Translokation von *TLX3* in den intergenischen Bereich downstream von *BCL11B* (Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001). Seltener ist auch das Gen *NKX2-5* betroffen (Przybylski *et al.*, 2006). Bisher wurde angenommen, dass durch die Translokationen beide Onkogene durch cis-regulatorische Elemente von *BCL11B* hochreguliert werden und als Tumortreiber in der T-ALL wirken (Bernard *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013; Przybylski *et al.*, 2006). Es wurden jedoch noch nicht die Auswirkungen der Translokationen auf den Tumorsuppressor *BCL11B* funktionell untersucht.

Wir beobachten, dass Mäuse mit einem intergenischen Knockout der cis-regulatorischen Region downstream von *Bcl11b* mit einer hohen Inzidenz T-ALL entwickeln. Dieser Phänotyp der Mäuse ist am ehesten durch die erniedrigte Expression des Tumorsuppressors *Bcl11b* zu erklären, die durch den Funktionsverlust von cis-regulatorischen Elementen entsteht. Bei den beschriebenen Translokationen wird auch *BCL11B* von Teilen seiner über eine Megabase großen, potentiellen regulatorischen Region getrennt. Demnach deutet unsere Studie darauf hin, dass es neben der Aktivierung von *TLX3* und *NKX2-5* auch zur epigenetischen Dysregulation von *BCL11B* als Treiber der T-ALL kommt. Dies würde auch erklären, warum es so häufig zu Translokationen in genau diesen Bereich kommt (Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013). Gleichzeitig käme es durch die Translokationen nur zu

einem subtilen Effekt auf die Expression von *BCL11B*, der bereits tumorigen ist. Unsere Daten deuten somit darauf hin, dass *BCL11B* ein quasi-insuffizientes Tumorsuppressorgen ist (Alimonti *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2011).

In diesem Sinne werden in einer neueren Studie auch Translokationen von *ZEB2* in den intergenischen Bereich downstream von *BCL11B* in der T-ALL beschrieben (Goossens *et al.*, 2015). In dieser Studie wurden im Unterschied zu früheren Studien über die Translokationen von *TLX3* und *NKX2-5* (Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013) die T-ALL Tumore weiter subklassifiziert (Goossens *et al.*, 2015). Es zeigte sich, dass es insbesondere zur Entstehung der aggressiven Unterform der ETP-ALL kommt (Goossens *et al.*, 2015). Dies steht in Einklang mit unseren Beobachtungen, dass 1Mb- und 105Kb-KO Mäuse eine Vorläufer-T-ALL entwickeln. Außerdem wird in ETP-ALL eine erniedrigte Expression von *BCL11B* beschrieben (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2017; Treanor *et al.*, 2014). Diese T-Zell-Vorläuferleukämie wurde erst vor einigen Jahren beschrieben und erst in der 4. Klassifikation der WHO als eigenständige Entität aufgenommen (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Wenzinger *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2012). Demnach wurde in den früheren Publikationen, in denen die Translokationen von *TLX3* und *NKX2-5* charakterisiert wurden, diese Unterform noch nicht unterschieden (Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2001; Przybylski *et al.*, 2006). Es ist somit bisher noch unklar, ob auch diese Translokationen zur Entstehung der Vorläufer-T-ALL führen.

Entsprechend deutet diese Studie darauf hin, dass bei 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-ALL rezidivierende Translokationen downstream von *BCL11B* neben der Überexpression von Onkogenen auch durch die epigenetische Dysregulation des quasi-insuffizienten Tumorsuppressors *BCL11B* als Treiber der T-ALL fungieren.

10.5 Knockout-Mausmodelle zur funktionellen Charakterisierung von regulatorischen Regionen in Tumoren

Durch epigenetische Analysen und großen Sequenzierstudien konnten genomweit regulatorische Regionen in verschiedenen Zelltypen, Geweben, Entwicklungsstufen und Krankheiten im Menschen und in der Maus identifiziert werden (Andersson *et al.*, 2014; Consortium, 2012; Consortium *et al.*, 2020; Dekker *et al.*, 2017; Gorkin *et al.*, 2020; Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015; Thurman *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2014). Um zu verstehen, wie die einzelnen Enhancer funktionieren, welche Gene sie regulieren und welche Rolle sie in der Entwicklung und bei bestimmten Krankheiten spielen, bedarf es jedoch umfassender funktioneller Studien (Gasperini *et al.*, 2020). *In vitro* gibt es hierfür verschiedene Ansätze. Für

massives paralleles Screening werden unter anderem Reporter-gen-Assays verwendet (Melnikov et al., 2012; Patwardhan et al., 2012; Patwardhan et al., 2009). Eine große Schwäche von diesen ist jedoch, dass der genomische Kontext nicht miteinbezogen wird (Gasperini *et al.*, 2020). Diesen Nachteil umgehen CRISPR/Cas-basierte Methoden, die im Wesentlichen aus zwei verschiedenen Ansätzen bestehen: (i) Einzelgenstudien und (ii) genomweite Screens (Gasperini *et al.*, 2020). Einzelgenstudien beruhen auf der Einfügung von Indels (Canver et al., 2015), Deletionen (Diao et al., 2017; Gasperini et al., 2017), CRISPRi (Fulco et al., 2016; Klann et al., 2017) und CRISPRa (Simeonov et al., 2017). Genomweite Screens basierten bisher auf der epigenetischen Perturbation (Gasperini et al., 2019; Xie et al., 2017). Der Nachteil von *in vitro* Studien ist jedoch, dass die Enhancer nur in bestimmten zellulären Kontexten untersucht werden und keine Aussage auf den Phänotyp des Organismus getroffen werden kann (Gasperini *et al.*, 2020). Um die Funktion des Enhancers in der Entwicklung und in allen Zellen eines Organismus verstehen zu können, bedarf es deswegen an *in vivo* Studien.

In vivo Studien im Menschen sind auf eQTL-Studien („expression quantitative trait locus“) beschränkt (Gasperini *et al.*, 2020). Bei diesen wird der Effekt von Veränderungen in regulatorischen Elementen auf die Expression von in cis gelegenen Genen untersucht (Consortium et al., 2017). Die Nachteile sind jedoch, dass es in der Bevölkerung verbreitete genomische Varianten des Enhancers geben muss, dass nur ein bestimmter zellulärer Kontext untersucht wird (meist Blut, wegen der leichten Probengewinnung) und dass eine hohe Zahl an Individuen notwendig ist (Consortium *et al.*, 2017; Strober et al., 2019; van der Wijst et al., 2018). Für funktionelle Enhancerstudien haben sich deshalb *in vivo* Systeme in der Maus etabliert. Insbesondere Assays mit Reporter-genen sind ein häufig verwendetes Medium (Kvon, 2015; Kvon et al., 2020; Pennacchio et al., 2006). Während die Rolle des Enhancer in der Entwicklung charakterisiert werden kann, ist eine große Schwäche der Reporterassays auch hier, dass die regulatorischen Elemente aus dem genomischen Kontext entfernt werden (Gasperini *et al.*, 2020). Dies kann mit Methoden der epigenetischen Perturbation und der Deletion des Enhancers umgangen werden. Erst kürzlich wurde CRISPRi für die Validierung von cis-regulatorischen Elementen *in vivo* verwendet (Li et al., 2020). Aber auch hier gibt es entscheidende Nachteile: (i) die Funktion von CRISPRi hängt vom lokalen Chromatinstatus ab und (ii) CRISPRi fügt epigenetische Veränderungen über mehrere hundert Basenpaare ein und agiert deswegen nicht gezielt (Goyal et al., 2017; Larson et al., 2013; Thakore et al., 2015). Für die funktionelle Validierung von Enhancern in der Entwicklung hat sich bereits der CRISPR/Cas9-basierte Knockout als robustes und präzises Mittel erwiesen (Canver *et al.*, 2015; Cunningham et al., 2018; Dickel et al., 2018; Hay *et al.*, 2016; Lupianez et al., 2015;

Osterwalder et al., 2018; Seo et al., 2018; Zhou et al., 2014). Die Funktion von Enhancern in der Entstehung von Neoplasien wurde jedoch bisher nur vereinzelt untersucht und es fehlen noch viele weitere Studien, um die komplexe Rolle von cis-regulatorischen Elementen systematisch in Tumoren zu verstehen (Bahr *et al.*, 2018; Herranz et al., 2014; Sur et al., 2012). Ein Nachteil von Knockout-Studien in der Maus ist jedoch, dass für Rückschlüsse auf Erkrankungen im Menschen eine starke Konservierung zwischen beiden Spezies vorliegen muss (Gasperini *et al.*, 2020).

In dieser Studie hat sich der Knockout der stark konservierten intergenischen Region downstream von *Bcl11b* als sehr robustes Mittel für die Untersuchung der Rolle dieser Enhancer-Region in der T-ALL erwiesen. Dieser Phänotyp ist in beiden Mauskohorten erst nach 200 bis 400 Tagen entstanden. Dies zeigt, dass beide Deletionen über die gesamte Lebensspanne der Maus zu einer stabilen Reduzierung der Expression des Tumorsuppressors *Bcl11b* geführt haben. Auch konnte der Effekt und die Toxizität des Enhancer-Knockouts auf die Entwicklung und die verschiedenen Zellsysteme des Organismus untersucht werden. Hier zeigte sich, dass die intergenische regulatorische Region von *Bcl11b* auch in soliden Tumoren und B-Zell-Lymphomen eine Rolle spielt. Außerdem konnte durch dieses Modell auch eine sehr subtile Dysregulation von *Bcl11b* erreicht werden, die auch bereits tumorigen wirkt. Somit konnte die Quasi-Insuffizienz des Tumorsuppressors *Bcl11b* untersucht werden (Alimonti *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2011).

In dieser Studie wurde aber noch das Cre/LoxP-System für die Generierung des Knockouts verwendet. Effizienter und schneller in der Anwendung sind die heutzutage viel eingesetzten CRISPR/Cas-basierten gentechnischen Technologien (Huang et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mausmodelle ein wesentliches Medium für die funktionelle Studie von Enhancern im gesamten Organismus und in Erkrankungen sind. Insbesondere Knockout-Studien stellen ein robustes System dar, das sich in dieser Studie auch in der Analyse von cis-regulatorischen Elementen im Krebs als zuverlässig erwiesen hat und in Zukunft auch die Studie von weiteren quasi-insuffizienten Tumorsuppressorgen ermöglichen kann.

11.7 Fazit und Ausblick

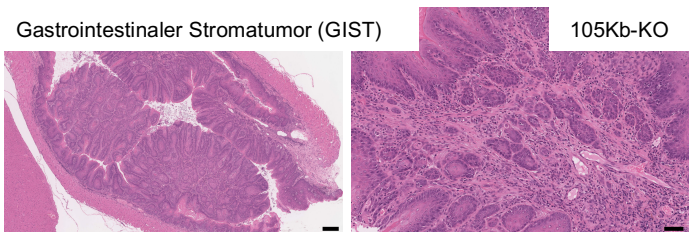
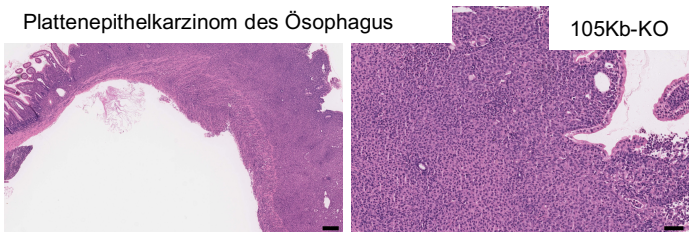
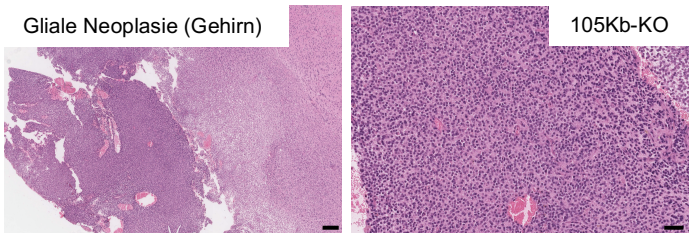
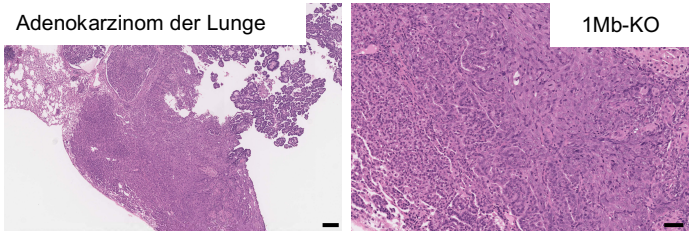
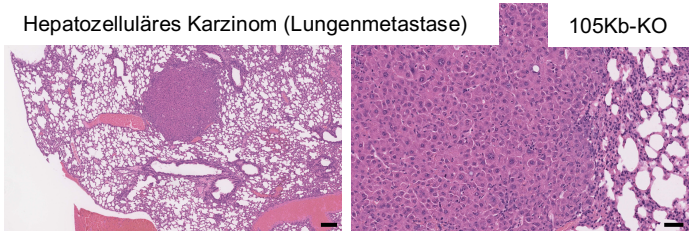
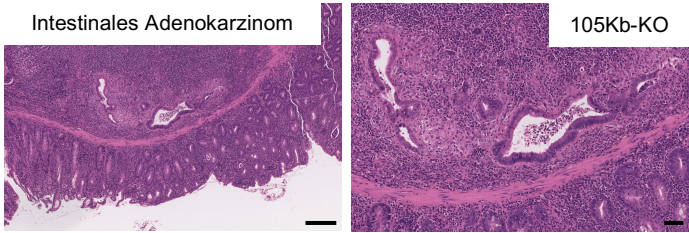
Durch umfassende Sequenzierstudien und funktionelle Analysen konnten Krebsgene bereits in einer Vielzahl von Tumoren identifiziert und validiert werden (Forbes et al., 2011; Garraway and Lander, 2013; Lawrence et al., 2014; Vogelstein et al., 2013). Durch genomweite

Assoziationsstudien (GWAS) in Tumoren zeigte sich jedoch auch, dass der Großteil der SNPs im nicht-kodierenden Bereich des Genoms liegen (Freedman *et al.*, 2011; Nishizaki and Boyle, 2017). Konsortien wie ENCODE, FANTOM und ROADMAP haben bereits eine Vielzahl dieser Mutationen bestimmten funktionellen Elementen wie Enhancern und lncRNAs zugeordnet (Consortium, 2012; Consortium *et al.*, 2020; de Hoon *et al.*, 2015; Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015). Es fehlt aber an funktionellen Studien, um die Rolle der Mutationen und epigenetischen Veränderungen im nicht-kodierenden Teil des Genoms zu verstehen.

In dieser Studie wurde mithilfe von zwei Knockout-Mausmodellen die Rolle eines intergenischen Bereichs downstream von *Bcl11b* in der T-ALL und anderen Neoplasien herausgearbeitet. So prädisponiert der Knockout der intergenischen Region downstream von *Bcl11b* bei Mäusen je nach Allelstatus und Größe der Deletion zu einem variablen Phänotyp: während heterozygote Mäuse mit kleinem Knockout vermehrt solide und B-Zell-Tumore entwickeln, sind Mäuse mit einer großen Deletion auf beiden Allelen insbesondere anfällig für eine Vorläufer-T-ALL. Aufgrund der starken humanen Konservierung der untersuchten genomischen Region und rezidivierenden Translokationen in diesen Bereich in der humanen T-ALL hat diese Studie eine Implikation in bis zu 20-25% der kindlichen und 5% der erwachsenen T-Zell-Leukämien (Asnafi *et al.*, 2005; Ballerini *et al.*, 2002; Belver and Ferrando, 2016; Bernard *et al.*, 2001).

Weitere funktionelle Studien sind notwendig, um das gesamte Enhancer-Cluster downstream von *BCL11B* ausführlich zu charakterisieren und alle beteiligten Enhancer-Untereinheiten und deren strukturellen Aufbau zu untersuchen. Der individuelle Knockout oder die epigenetische Modulation der einzelnen Enhancerbereiche könnte weitere Einblicke erbringen. Auch Mutagenesescrines durch CRISPR/Cas9 eingefügte Indels würden dabei helfen, Sequenzbereiche herauszuarbeiten, die für die Funktion der Enhancer wesentlich sind. Schließlich sollte auch die Rolle der Region downstream von *BCL11B* in B-Zell-Lymphomen und soliden Tumoren weiter untersucht werden.

10. Anhang



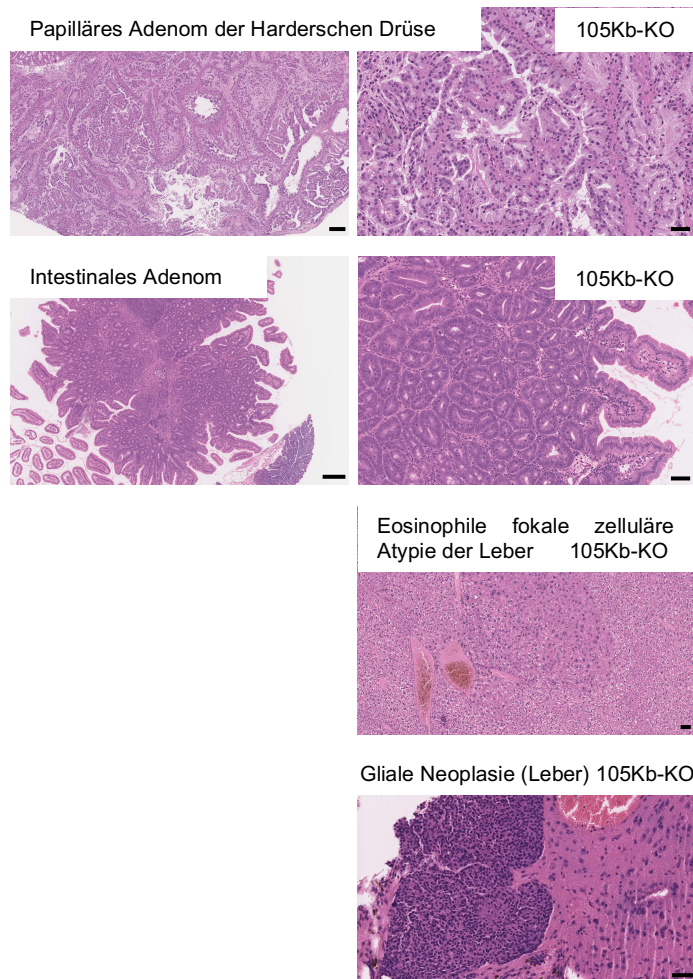


Abbildung 15 | Solide Tumore in 105Kb- und 1Mb-KO Mäusen.

Mikroskopische Bilder der H&E-Färbungen von repräsentativen soliden Tumoren, die in 105Kb- und 1Mb-KO Mäusen entstanden sind. Maßstableiste, 200µm (linke Seite) und 50µm (rechte Seite).

11. Literaturverzeichnis

- Adams, D.J., Biggs, P.J., Cox, T., Davies, R., van der Weyden, L., Jonkers, J., Smith, J., Plumb, B., Taylor, R., Nishijima, I., et al. (2004). Mutagenic insertion and chromosome engineering resource (MICER). *Nat Genet* 36, 867-871. 10.1038/ng1388.
- Alimonti, A., Carracedo, A., Clohessy, J.G., Trotman, L.C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W.J., Brogi, E., et al. (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* 42, 454-458. 10.1038/ng.556.
- Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., et al. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 507, 455-461. 10.1038/nature12787.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J.D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221. 10.1016/j.neuron.2004.12.036.
- Asnafi, V., Buzyn, A., Thomas, X., Huguet, F., Vey, N., Boiron, J.M., Reman, O., Cayuela, J.M., Lheritier, V., Vernant, J.P., et al. (2005). Impact of TCR status and genotype on outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a LALA-94 study. *Blood* 105, 3072-3078. 10.1182/blood-2004-09-3666.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D.J., Ishmael, J.E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* 275, 10315-10322. 10.1074/jbc.275.14.10315.
- Bahr, C., von Paleske, L., Uslu, V.V., Remeseiro, S., Takayama, N., Ng, S.W., Murison, A., Langenfeld, K., Petretich, M., Scognamiglio, R., et al. (2018). A Myc enhancer cluster regulates normal and leukaemic haematopoietic stem cell hierarchies. *Nature* 553, 515-520. 10.1038/nature25193.
- Baldus, C., and Balabanov, S. (2020). Akute Leukämie. In: Honecker, Claßen, Preiß, Dornoff, Herausgeber. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2020/21. Zuckschwerdt Verlag München; 20. Auflage; 2020. S. 1-5.
- Ballerini, P., Blaise, A., Busson-Le Coniat, M., Su, X.Y., Zucman-Rossi, J., Adam, M., van den Akker, J., Perot, C., Pellegrino, B., Landman-Parker, J., et al. (2002). HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 100, 991-997. 10.1182/blood-2001-11-0093.
- Belver, L., and Ferrando, A. (2016). The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 16, 494-507. 10.1038/nrc.2016.63.
- Berger, A.H., Knudson, A.G., and Pandolfi, P.P. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476, 163-169. 10.1038/nature10275.
- Bernard, O.A., Busson-LeConiat, M., Ballerini, P., Mauchauffe, M., Della Valle, V., Monni, R., Nguyen Khac, F., Mercher, T., Penard-Lacronique, V., Pasturaud, P., et al. (2001). A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15, 1495-1504. 10.1038/sj.leu.2402249.
- Bulger, M., and Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144, 327-339. 10.1016/j.cell.2011.01.024.
- Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* 25, 1915-1927. 10.1101/gad.17446611.
- Calderon, L., and Boehm, T. (2012). Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell* 149, 159-172. 10.1016/j.cell.2012.01.049.
- Cannavo, E., Khoueiry, P., Garfield, D.A., Geeleher, P., Zichner, T., Gustafson, E.H., Ciglar, L., Korbel, J.O., and Furlong, E.E. (2016). Shadow Enhancers Are Pervasive Features of Developmental Regulatory Networks. *Curr Biol* 26, 38-51. 10.1016/j.cub.2015.11.034.
- Canver, M.C., Smith, E.C., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N.E., Shalem, O., Chen, D.D., Schupp, P.G., Vinjamur, D.S., Garcia, S.P., et al. (2015). BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* 527, 192-197. 10.1038/nature15521.

- Chong, M.M., Simpson, N., Ciofani, M., Chen, G., Collins, A., and Littman, D.R. (2010). Epigenetic propagation of CD4 expression is established by the Cd4 proximal enhancer in helper T cells. *Genes Dev* 24, 659-669. 10.1101/gad.1901610.
- Consortium, E.P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74. 10.1038/nature11247.
- Consortium, E.P., Moore, J.E., Purcaro, M.J., Pratt, H.E., Epstein, C.B., Shores, N., Adrian, J., Kawli, T., Davis, C.A., Dobin, A., et al. (2020). Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature* 583, 699-710. 10.1038/s41586-020-2493-4.
- Consortium, G.T., Laboratory, D.A., Coordinating Center -Analysis Working, G., Statistical Methods groups-Analysis Working, G., Enhancing, G.g., Fund, N.I.H.C., Nih/Nci, Nih/Nhgri, Nih/Nimh, Nih/Nida, et al. (2017). Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature* 550, 204-213. 10.1038/nature24277.
- Constan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., et al. (2009). Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 10, 147-156. 10.1016/S1470-2045(08)70314-0.
- Cramer, P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573, 45-54. 10.1038/s41586-019-1517-4.
- Cunningham, T.J., Lancman, J.J., Berenguer, M., Dong, P.D.S., and Duester, G. (2018). Genomic Knockout of Two Presumed Forelimb Tbx5 Enhancers Reveals They Are Nonessential for Limb Development. *Cell Rep* 23, 3146-3151. 10.1016/j.celrep.2018.05.052.
- de Hoon, M., Shin, J.W., and Carninci, P. (2015). Paradigm shifts in genomics through the FANTOM projects. *Mamm Genome* 26, 391-402. 10.1007/s00335-015-9593-8.
- de la Rosa, J., Weber, J., Friedrich, M.J., Li, Y., Rad, L., Ponstingl, H., Liang, Q., de Quiros, S.B., Noorani, I., Metzakopian, E., et al. (2017). A single-copy Sleeping Beauty transposon mutagenesis screen identifies new PTEN-cooperating tumor suppressor genes. *Nat Genet* 49, 730-741. 10.1038/ng.3817.
- DeAngelo, D.J., Stevenson, K.E., Dahlberg, S.E., Silverman, L.B., Couban, S., Supko, J.G., Amrein, P.C., Ballen, K.K., Seftel, M.D., Turner, A.R., et al. (2015). Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18-50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 29, 526-534. 10.1038/leu.2014.229.
- Dekker, J., Belmont, A.S., Guttman, M., Leshyk, V.O., Lis, J.T., Lomvardas, S., Mirny, L.A., O'Shea, C.C., Park, P.J., Ren, B., et al. (2017). The 4D nucleome project. *Nature* 549, 219-226. 10.1038/nature23884.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 22, 1775-1789. 10.1101/gr.132159.111.
- Diao, Y., Fang, R., Li, B., Meng, Z., Yu, J., Qiu, Y., Lin, K.C., Huang, H., Liu, T., Marina, R.J., et al. (2017). A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells. *Nat Methods* 14, 629-635. 10.1038/nmeth.4264.
- Dickel, D.E., Ypsilanti, A.R., Pla, R., Zhu, Y., Barozzi, I., Mannion, B.J., Khin, Y.S., Fukuda-Yuzawa, Y., Plajzer-Frick, I., Pickle, C.S., et al. (2018). Ultraconserved Enhancers Are Required for Normal Development. *Cell* 172, 491-499 e415. 10.1016/j.cell.2017.12.017.
- Dukler, N., Gulko, B., Huang, Y.F., and Siepel, A. (2016). Is a super-enhancer greater than the sum of its parts? *Nat Genet* 49, 2-3. 10.1038/ng.3759.
- Dupuy, A.J., Akagi, K., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2005). Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* 436, 221-226. 10.1038/nature03691.
- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvaggio, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2011). The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175-187. 10.1016/j.immuni.2011.02.005.
- Elkon, R., and Agami, R. (2017). Characterization of noncoding regulatory DNA in the human genome. *Nat Biotechnol* 35, 732-746. 10.1038/nbt.3863.

- Escherich, G., Schrappe, M., and Creutzig, U. (2016). S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter. AWMF-Leitlinien-Registernummer 025/014. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014l_S1_Akute_lymphoblastische_Leukaemie_ALL_2016-04.pdf.
- Fischer, A., Lersch, R., de Andrade Kratzig, N., Strong, A., Friedrich, M.J., Weber, J., Engleitner, T., Ollinger, R., Yen, H.Y., Kohlhofer, U., et al. (2023). In vivo interrogation of regulatory genomes reveals extensive quasi-insufficiency in cancer evolution. *Cell Genom* 3, 100276. 10.1016/j.xgen.2023.100276.
- Forbes, S.A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C.Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., et al. (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39, D945-950. 10.1093/nar/gkq929.
- Freedman, M.L., Monteiro, A.N., Gayther, S.A., Coetzee, G.A., Risch, A., Plass, C., Casey, G., De Biasi, M., Carlson, C., Duggan, D., et al. (2011). Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nat Genet* 43, 513-518. 10.1038/ng.840.
- Frese, K.K., and Tuveson, D.A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7, 645-658. 10.1038/nrc2192.
- Friedrich, M.J., Rad, L., Bronner, I.F., Strong, A., Wang, W., Weber, J., Mayho, M., Ponstingl, H., Engleitner, T., Grove, C., et al. (2017). Genome-wide transposon screening and quantitative insertion site sequencing for cancer gene discovery in mice. *Nat Protoc* 12, 289-309. 10.1038/nprot.2016.164.
- Fulco, C.P., Munschauer, M., Anyoha, R., Munson, G., Grossman, S.R., Perez, E.M., Kane, M., Cleary, B., Lander, E.S., and Engreitz, J.M. (2016). Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference. *Science* 354, 769-773. 10.1126/science.aag2445.
- Garraway, L.A., and Lander, E.S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell* 153, 17-37. 10.1016/j.cell.2013.03.002.
- Gasperini, M., Findlay, G.M., McKenna, A., Milbank, J.H., Lee, C., Zhang, M.D., Cusanovich, D.A., and Shendure, J. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated Scanning for Regulatory Elements Required for HPRT1 Expression via Thousands of Large, Programmed Genomic Deletions. *Am J Hum Genet* 101, 192-205. 10.1016/j.ajhg.2017.06.010.
- Gasperini, M., Hill, A.J., McFaline-Figueroa, J.L., Martin, B., Kim, S., Zhang, M.D., Jackson, D., Leith, A., Schreiber, J., Noble, W.S., et al. (2019). A Genome-wide Framework for Mapping Gene Regulation via Cellular Genetic Screens. *Cell* 176, 377-390 e319. 10.1016/j.cell.2018.11.029.
- Gasperini, M., Tome, J.M., and Shendure, J. (2020). Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers. *Nat Rev Genet* 21, 292-310. 10.1038/s41576-019-0209-0.
- Goossens, S., Radaelli, E., Blanchet, O., Durinck, K., Van der Meulen, J., Peirs, S., Taghon, T., Tremblay, C.S., Costa, M., Farhang Ghahremani, M., et al. (2015). ZEB2 drives immature T-cell lymphoblastic leukaemia development via enhanced tumour-initiating potential and IL-7 receptor signalling. *Nat Commun* 6, 5794. 10.1038/ncomms6794.
- Gordon, C.T., and Lyonnet, S. (2014). Enhancer mutations and phenotype modularity. *Nat Genet* 46, 3-4. 10.1038/ng.2861.
- Gorkin, D.U., Barozzi, I., Zhao, Y., Zhang, Y., Huang, H., Lee, A.Y., Li, B., Chiou, J., Wildberg, A., Ding, B., et al. (2020). An atlas of dynamic chromatin landscapes in mouse fetal development. *Nature* 583, 744-751. 10.1038/s41586-020-2093-3.
- Goyal, A., Myacheva, K., Gross, M., Klingenberg, M., Duran Arque, B., and Diederichs, S. (2017). Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res* 45, e12. 10.1093/nar/gkw883.
- Gudmundsson, K.O., Stull, S.W., and Keller, J.R. (2012). Transplantation of mouse fetal liver cells for analyzing the function of hematopoietic stem and progenitor cells. *Methods Mol Biol* 879, 123-133. 10.1007/978-1-61779-815-3_8.
- Gutierrez, A., Kentsis, A., Sanda, T., Holmfeldt, L., Chen, S.C., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Dahlberg, S.E., Neuberg, D.S., et al. (2011). The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 4169-4173. 10.1182/blood-2010-11-318873.
- Ha, V.L., Luong, A., Li, F., Casero, D., Malvar, J., Kim, Y.M., Bhatia, R., Crooks, G.M., and Parekh, C. (2017). The T-ALL related gene BCL11B regulates the initial stages of human T-cell differentiation. *Leukemia* 31, 2503-2514. 10.1038/leu.2017.70.

- Hay, D., Hughes, J.R., Babbs, C., Davies, J.O.J., Graham, B.J., Hanssen, L., Kassouf, M.T., Marieke Oudelaar, A.M., Sharpe, J.A., Suci, M.C., et al. (2016). Genetic dissection of the alpha-globin super-enhancer in vivo. *Nat Genet* *48*, 895-903. 10.1038/ng.3605.
- Haydu, J.E., and Ferrando, A.A. (2013). Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Curr Opin Hematol* *20*, 369-373. 10.1097/MOH.0b013e3283623c61.
- He, Z., Liao, Z., Chen, S., Li, B., Yu, Z., Luo, G., Yang, L., Zeng, C., and Li, Y. (2018). Downregulated miR-17, miR-29c, miR-92a and miR-214 may be related to BCL11B overexpression in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol* *14*, e259-e265. 10.1111/ajco.12979.
- Heinz, S., Romanoski, C.E., Benner, C., and Glass, C.K. (2015). The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 144-154. 10.1038/nrm3949.
- Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Palomero, T., Schnell, S.A., Belver, L., Wendorff, A.A., Xu, L., Castillo-Martin, M., Llobet-Navas, D., Cordon-Cardo, C., et al. (2014). A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* *20*, 1130-1137. 10.1038/nm.3665.
- Hnisz, D., Abraham, B.J., Lee, T.I., Lau, A., Saint-Andre, V., Sigova, A.A., Hoke, H.A., and Young, R.A. (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* *155*, 934-947. 10.1016/j.cell.2013.09.053.
- Hong, J.W., Hendrix, D.A., and Levine, M.S. (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science* *321*, 1314. 10.1126/science.1160631.
- Hosokawa, H., Romero-Wolf, M., Yang, Q., Motomura, Y., Levanon, D., Groner, Y., Moro, K., Tanaka, T., and Rothenberg, E.V. (2020). Cell type-specific actions of Bcl11b in early T-lineage and group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med* *217*. 10.1084/jem.20190972.
- Hu, G., Cui, K., Fang, D., Hirose, S., Wang, X., Wangsa, D., Jin, W., Ried, T., Liu, P., Zhu, J., et al. (2018). Transformation of Accessible Chromatin and 3D Nucleome Underlies Lineage Commitment of Early T Cells. *Immunity* *48*, 227-242 e228. 10.1016/j.immuni.2018.01.013.
- Huang, J., Chen, M., Whitley, M.J., Kuo, H.C., Xu, E.S., Walens, A., Mowery, Y.M., Van Mater, D., Eward, W.C., Cardona, D.M., et al. (2017). Generation and comparison of CRISPR-Cas9 and Cre-mediated genetically engineered mouse models of sarcoma. *Nat Commun* *8*, 15999. 10.1038/ncomms15999.
- Huang, X., Chen, S., Shen, Q., Yang, L., Li, B., Zhong, L., Geng, S., Du, X., and Li, Y. (2010). Analysis of the expression pattern of the BCL11B gene and its relatives in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* *3*, 44. 10.1186/1756-8722-3-44.
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* *21*, 1253-1261. 10.1038/nm.3981.
- Huguet, F., Chevret, S., Leguay, T., Thomas, X., Boissel, N., Escoffre-Barbe, M., Chevallier, P., Hunault, M., Vey, N., Bonmati, C., et al. (2018). Intensified Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Report of the Randomized GRAALL-2005 Clinical Trial. *J Clin Oncol* *36*, 2514-2523. 10.1200/JCO.2017.76.8192.
- Hunger, S.P., and Mullighan, C.G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med* *373*, 1541-1552. 10.1056/NEJMra1400972.
- Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2010). An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* *329*, 93-96. 10.1126/science.1188995.
- Ing-Simmons, E., Seitan, V.C., Faure, A.J., Flicek, P., Carroll, T., Dekker, J., Fisher, A.G., Lenhard, B., and Merckenschlager, M. (2015). Spatial enhancer clustering and regulation of enhancer-proximal genes by cohesin. *Genome Res* *25*, 504-513. 10.1101/gr.184986.114.
- Isoda, T., Moore, A.J., He, Z., Chandra, V., Aida, M., Denholtz, M., Piet van Hamburg, J., Fisch, K.M., Chang, A.N., Fahl, S.P., et al. (2017a). Non-coding Transcription Instructs Chromatin Folding and Compartmentalization to Dictate Enhancer-Promoter Communication and T Cell Fate. *Cell* *171*, 103-119.e118. 10.1016/j.cell.2017.09.001.
- Isoda, T., Moore, A.J., He, Z., Chandra, V., Aida, M., Denholtz, M., Piet van Hamburg, J., Fisch, K.M., Chang, A.N., Fahl, S.P., et al. (2017b). Non-coding Transcription Instructs Chromatin Folding and Compartmentalization to Dictate Enhancer-Promoter Communication and T Cell Fate. *Cell* *171*, 103-119 e118. 10.1016/j.cell.2017.09.001.

- Jain, P., Kantarjian, H., Ravandi, F., Thomas, D., O'Brien, S., Kadia, T., Burger, J., Borthakur, G., Daver, N., Jabbour, E., et al. (2014). The combination of hyper-CVAD plus nelarabine as frontline therapy in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-lymphoblastic lymphoma: MD Anderson Cancer Center experience. *Leukemia* *28*, 973-975. 10.1038/leu.2013.312.
- Kakugawa, K., Kojo, S., Tanaka, H., Seo, W., Endo, T.A., Kitagawa, Y., Muroi, S., Tenno, M., Yasmin, N., Kohwi, Y., et al. (2017). Essential Roles of SATB1 in Specifying T Lymphocyte Subsets. *Cell Rep* *19*, 1176-1188. 10.1016/j.celrep.2017.04.038.
- Kamimura, K., Ohi, H., Kubota, T., Okazuka, K., Yoshikai, Y., Wakabayashi, Y., Aoyagi, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. (2007). Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* *355*, 538-542. 10.1016/j.bbrc.2007.02.003.
- Kantarjian, H., Thomas, D., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F., Jeha, S., Bueso-Ramos, C.E., Pierce, S., Shan, J., Koller, C., et al. (2004). Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer* *101*, 2788-2801. 10.1002/cncr.20668.
- Kim, R., Boissel, N., Touzart, A., Leguay, T., Thonier, F., Thomas, X., Raffoux, E., Huguet, F., Villarese, P., Fourrage, C., et al. (2020). Adult T-cell acute lymphoblastic leukemias with IL7R pathway mutations are slow-responders who do not benefit from allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia* *34*, 1730-1740. 10.1038/s41375-019-0685-4.
- Klann, T.S., Black, J.B., Chellappan, M., Safi, A., Song, L., Hilton, I.B., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2017). CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* *35*, 561-568. 10.1038/nbt.3853.
- Kozłowski, P., Åström, M., Ahlberg, L., Bernell, P., Hulegårdh, E., Hagglund, H., Karlsson, K., Markuszewska-Kuczynska, A., Tomaszewska-Toporska, B., Smedmyr, B., et al. (2014). High relapse rate of T cell acute lymphoblastic leukemia in adults treated with Hyper-CVAD chemotherapy in Sweden. *Eur J Haematol* *92*, 377-381. 10.1111/ejh.12269.
- Kranz, D.M., Saito, H., Distèche, C.M., Swisshelm, K., Pravtcheva, D., Ruddle, F.H., Eisen, H.N., and Tonegawa, S. (1985). Chromosomal locations of the murine T-cell receptor alpha-chain gene and the T-cell gamma gene. *Science* *227*, 941-945. 10.1126/science.3918347.
- Kueh, H.Y., Yui, M.A., Ng, K.K., Pease, S.S., Zhang, J.A., Damle, S.S., Freedman, G., Siu, S., Bernstein, I.D., Elowitz, M.B., and Rothenberg, E.V. (2016). Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment. *Nat Immunol* *17*, 956-965. 10.1038/ni.3514.
- Kvon, E.Z. (2015). Using transgenic reporter assays to functionally characterize enhancers in animals. *Genomics* *106*, 185-192. 10.1016/j.ygeno.2015.06.007.
- Kvon, E.Z., Waymack, R., Elabd, M.G., and Wunderlich, Z. (2021). Enhancer redundancy in development and disease. *Nat Rev Genet*. 10.1038/s41576-020-00311-x.
- Kvon, E.Z., Zhu, Y., Kelman, G., Novak, C.S., Plajzer-Frick, I., Kato, M., Garvin, T.H., Pham, Q., Harrington, A.N., Hunter, R.D., et al. (2020). Comprehensive In Vivo Interrogation Reveals Phenotypic Impact of Human Enhancer Variants. *Cell* *180*, 1262-1271 e1215. 10.1016/j.cell.2020.02.031.
- Kwon, S.B., and Ernst, J. (2021). Learning a genome-wide score of human-mouse conservation at the functional genomics level. *Nat Commun* *12*, 2495. 10.1038/s41467-021-22653-8.
- Lange, B.J., Raimondi, S.C., Heerema, N., Nowell, P.C., Minowada, J., Steinherz, P.E., Arenson, E.B., O'Connor, R., and Santoli, D. (1992). Pediatric leukemia/lymphoma with t(8;14)(q24;q11). *Leukemia* *6*, 613-618.
- Lange, S., Engleitner, T., Mueller, S., Maresch, R., Zwiebel, M., Gonzalez-Silva, L., Schneider, G., Banerjee, R., Yang, F., Vassiliou, G.S., et al. (2020). Analysis pipelines for cancer genome sequencing in mice. *Nat Protoc* *15*, 266-315. 10.1038/s41596-019-0234-7.
- Larson, M.H., Gilbert, L.A., Wang, X., Lim, W.A., Weissman, J.S., and Qi, L.S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc* *8*, 2180-2196. 10.1038/nprot.2013.132.
- Latos, P.A., Pauler, F.M., Koerner, M.V., Seneguin, H.B., Hudson, Q.J., Stocsits, R.R., Allhoff, W., Stricker, S.H., Klement, R.M., Warczok, K.E., et al. (2012). Air transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing. *Science* *338*, 1469-1472. 10.1126/science.1228110.

- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., and Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* *505*, 495-501. 10.1038/nature12912.
- Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2002). T cell development in culture. *Immunity* *17*, 689-692. 10.1016/s1074-7613(02)00477-6.
- Lepoivre, C., Belhocine, M., Bergon, A., Griffon, A., Yammine, M., Vanhille, L., Zacarias-Cabeza, J., Garibal, M.A., Koch, F., Maqbool, M.A., et al. (2013). Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators. *BMC Genomics* *14*, 914. 10.1186/1471-2164-14-914.
- Lessel, D., Gehbauer, C., Bramswig, N.C., Schluth-Bolard, C., Venkataramanappa, S., van Gassen, K.L.I., Hempel, M., Haack, T.B., Baresic, A., Genetti, C.A., et al. (2018). BCL11B mutations in patients affected by a neurodevelopmental disorder with reduced type 2 innate lymphoid cells. *Brain* *141*, 2299-2311. 10.1093/brain/awy173.
- Li, K., Liu, Y., Cao, H., Zhang, Y., Gu, Z., Liu, X., Yu, A., Kaphle, P., Dickerson, K.E., Ni, M., and Xu, J. (2020). Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nat Commun* *11*, 485. 10.1038/s41467-020-14362-5.
- Li, L., Leid, M., and Rothenberg, E.V. (2010a). An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* *329*, 89-93. 10.1126/science.1188989.
- Li, L., Zhang, J.A., Dose, M., Kueh, H.Y., Mosadeghi, R., Gounari, F., and Rothenberg, E.V. (2013). A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls its T-cell specific expression. *Blood* *122*, 902-911. 10.1182/blood-2012-08-447839.
- Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., et al. (2010b). Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* *329*, 85-89. 10.1126/science.1188063.
- Li, W., Notani, D., and Rosenfeld, M.G. (2016). Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat Rev Genet* *17*, 207-223. 10.1038/nrg.2016.4.
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdottir, H., Ghandi, M., Mesirov, J.P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* *1*, 417-425. 10.1016/j.cels.2015.12.004.
- Litman, G.W., Rast, J.P., and Fugmann, S.D. (2010). The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *10*, 543-553. 10.1038/nri2807.
- Litzow, M.R., and Ferrando, A.A. (2015). How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* *126*, 833-841. 10.1182/blood-2014-10-551895.
- Long, H.K., Prescott, S.L., and Wysocka, J. (2016). Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution. *Cell* *167*, 1170-1187. 10.1016/j.cell.2016.09.018.
- Longabaugh, W.J.R., Zeng, W., Zhang, J.A., Hosokawa, H., Jansen, C.S., Li, L., Romero-Wolf, M., Liu, P., Kueh, H.Y., Mortazavi, A., and Rothenberg, E.V. (2017). Bcl11b and combinatorial resolution of cell fate in the T-cell gene regulatory network. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 5800-5807. 10.1073/pnas.1610617114.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* *15*, 550. 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lupianez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J.M., Laxova, R., et al. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* *161*, 1012-1025. 10.1016/j.cell.2015.04.004.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemes, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., et al. (2015). Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* *161*, 1202-1214. 10.1016/j.cell.2015.05.002.
- Melnikov, A., Murugan, A., Zhang, X., Tesileanu, T., Wang, L., Rogov, P., Feizi, S., Gnirke, A., Callan, C.G., Jr., Kinney, J.B., et al. (2012). Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. *Nat Biotechnol* *30*, 271-277. 10.1038/nbt.2137.

- Morse, H.C., 3rd, Anver, M.R., Fredrickson, T.N., Haines, D.C., Harris, A.W., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Kogan, S.C., MacLennan, I.C., Pattengale, P.K., et al. (2002). Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* *100*, 246-258. 10.1182/blood.v100.1.246.
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewitz, B., Ollinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* *554*, 62-68. 10.1038/nature25459.
- Neumann, M., Vosberg, S., Schlee, C., Heesch, S., Schwartz, S., Gokbuget, N., Hoelzer, D., Graf, A., Krebs, S., Bartram, I., et al. (2015). Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget* *6*, 2754-2766. 10.18632/oncotarget.2218.
- Nishizaki, S.S., and Boyle, A.P. (2017). Mining the Unknown: Assigning Function to Noncoding Single Nucleotide Polymorphisms. *Trends Genet* *33*, 34-45. 10.1016/j.tig.2016.10.008.
- Oliveira, M.L., Akkapeddi, P., Ribeiro, D., Melao, A., and Barata, J.T. (2019). IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update. *Adv Biol Regul* *71*, 88-96. 10.1016/j.jbior.2018.09.012.
- Osterwalder, M., Barozzi, I., Tissieres, V., Fukuda-Yuzawa, Y., Mannion, B.J., Afzal, S.Y., Lee, E.A., Zhu, Y., Plajzer-Frick, I., Pickle, C.S., et al. (2018). Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. *Nature* *554*, 239-243. 10.1038/nature25461.
- Parekh, S., Ziegenhain, C., Vieth, B., Enard, W., and Hellmann, I. (2016). The impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq. *Sci Rep* *6*, 25533. 10.1038/srep25533.
- Patwardhan, R.P., Hiatt, J.B., Witten, D.M., Kim, M.J., Smith, R.P., May, D., Lee, C., Andrie, J.M., Lee, S.I., Cooper, G.M., et al. (2012). Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers in vivo. *Nat Biotechnol* *30*, 265-270. 10.1038/nbt.2136.
- Patwardhan, R.P., Lee, C., Litvin, O., Young, D.L., Pe'er, D., and Shendure, J. (2009). High-resolution analysis of DNA regulatory elements by synthetic saturation mutagenesis. *Nat Biotechnol* *27*, 1173-1175. 10.1038/nbt.1589.
- Pennacchio, L.A., Ahituv, N., Moses, A.M., Prabhakar, S., Nobrega, M.A., Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K.D., et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* *444*, 499-502. 10.1038/nature05295.
- Pinkney, K.A., Jiang, W., Lee, B.J., Loredan, D.G., Li, C., Bhagat, G., and Zha, S. (2015). Haploinsufficiency of Bcl11b suppresses the progression of ATM-deficient T cell lymphomas. *J Hematol Oncol* *8*, 94. 10.1186/s13045-015-0191-8.
- Pott, S., and Lieb, J.D. (2015). What are super-enhancers? *Nat Genet* *47*, 8-12. 10.1038/ng.3167.
- Przybylski, G.K., Dik, W.A., Grabarczyk, P., Wanzeck, J., Chudobska, P., Jankowski, K., von Bergh, A., van Dongen, J.J., Schmidt, C.A., and Langerak, A.W. (2006). The effect of a novel recombination between the homeobox gene NKX2-5 and the TRD locus in T-cell acute lymphoblastic leukemia on activation of the NKX2-5 gene. *Haematologica* *91*, 317-321.
- Quinn, J.J., and Chang, H.Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* *17*, 47-62. 10.1038/nrg.2015.10.
- Rad, R., Rad, L., Wang, W., Cadinanos, J., Vassiliou, G., Rice, S., Campos, L.S., Yusa, K., Banerjee, R., Li, M.A., et al. (2010). PiggyBac transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice. *Science* *330*, 1104-1107. 10.1126/science.1193004.
- Rad, R., Rad, L., Wang, W., Strong, A., Pongstingl, H., Bronner, I.F., Mayho, M., Steiger, K., Weber, J., Hieber, M., et al. (2015). A conditional piggyBac transposition system for genetic screening in mice identifies oncogenic networks in pancreatic cancer. *Nat Genet* *47*, 47-56. 10.1038/ng.3164.
- Ransohoff, J.D., Wei, Y., and Khavari, P.A. (2018). The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* *19*, 143-157. 10.1038/nrm.2017.104.
- Redecke, V., Wu, R., Zhou, J., Finkelstein, D., Chaturvedi, V., High, A.A., and Hacker, H. (2013). Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nat Methods* *10*, 795-803. 10.1038/nmeth.2510.
- Ribera, J.M., Ortega, J.J., Oriol, A., Bastida, P., Calvo, C., Perez-Hurtado, J.M., Gonzalez-Valentin, M.E., Martin-Reina, V., Molines, A., Ortega-Rivas, F., et al. (2007). Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stem-cell transplantation as postremission

- treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial. *J Clin Oncol* 25, 16-24. 10.1200/JCO.2006.06.8312.
- Roadmap Epigenomics, C., Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., et al. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518, 317-330. 10.1038/nature14248.
- Rothenberg, E.V. (2019). Programming for T-lymphocyte fates: modularity and mechanisms. *Genes Dev* 33, 1117-1135. 10.1101/gad.327163.119.
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushima, Y., Tamura, M., and Shiroishi, T. (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132, 797-803. 10.1242/dev.01613.
- Sanchez-Martin, M., and Ferrando, A. (2017). The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, 1124-1133. 10.1182/blood-2016-09-692582.
- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., et al. (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98, 3413-3420. 10.1182/blood.v98.12.3413.
- Schmitt, A.M., and Chang, H.Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* 29, 452-463. 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- Schmitt, T.M., de Pooter, R.F., Gronski, M.A., Cho, S.K., Ohashi, P.S., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* 5, 410-417. 10.1038/ni1055.
- Schwartz, S., Kent, W.J., Smit, A., Zhang, Z., Baertsch, R., Hardison, R.C., Haussler, D., and Miller, W. (2003). Human-mouse alignments with BLASTZ. *Genome Res* 13, 103-107. 10.1101/gr.809403.
- Seo, H., Amano, T., Seki, R., Sagai, T., Kim, J., Cho, S.W., and Shiroishi, T. (2018). Upstream Enhancer Elements of Shh Regulate Oral and Dental Patterning. *J Dent Res* 97, 1055-1063. 10.1177/0022034518758642.
- Serafin, V., Lissandron, V., Buldini, B., Bresolin, S., Paganin, M., Grillo, F., Andriano, N., Palmi, C., Cazzaniga, G., Marmiroli, S., et al. (2017). Phosphoproteomic analysis reveals hyperactivation of mTOR/STAT3 and LCK/Calcineurin axes in pediatric early T-cell precursor ALL. *Leukemia* 31, 1007-1011. 10.1038/leu.2017.13.
- Shah, D.K., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* 192, 4017-4023. 10.4049/jimmunol.1302259.
- Shin, H.Y., Willi, M., HyunYoo, K., Zeng, X., Wang, C., Metser, G., and Hennighausen, L. (2016). Hierarchy within the mammary STAT5-driven Wap super-enhancer. *Nat Genet* 48, 904-911. 10.1038/ng.3606.
- Shinbo, T., Matsuki, A., Matsumoto, Y., Kosugi, S., Takahashi, Y., Niwa, O., and Kominami, R. (1999). Allelic loss mapping and physical delineation of a region harboring a putative thymic lymphoma suppressor gene on mouse chromosome 12. *Oncogene* 18, 4131-4136. 10.1038/sj.onc.1202767.
- Shlyueva, D., Stampfel, G., and Stark, A. (2014). Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet* 15, 272-286. 10.1038/nrg3682.
- Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., et al. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med* 208, 901-908. 10.1084/jem.20110580.
- Simeonov, D.R., Gowen, B.G., Boontanart, M., Roth, T.L., Gagnon, J.D., Mumbach, M.R., Satpathy, A.T., Lee, Y., Bray, N.L., Chan, A.Y., et al. (2017). Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation. *Nature* 549, 111-115. 10.1038/nature23875.
- Spitz, F., and Furlong, E.E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* 13, 613-626. 10.1038/nrg3207.
- Statello, L., Guo, C.J., Chen, L.L., and Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96-118. 10.1038/s41580-020-00315-9.

- Stenberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* *150*, 467-486. 10.1016/0022-2836(81)90375-2.
- Stock, W., Luger, S.M., Advani, A.S., Yin, J., Harvey, R.C., Mullighan, C.G., Willman, C.L., Fulton, N., Laumann, K.M., Malnassy, G., et al. (2019). A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood* *133*, 1548-1559. 10.1182/blood-2018-10-881961.
- Strober, B.J., Elorbany, R., Rhodes, K., Krishnan, N., Tayeb, K., Battle, A., and Gilad, Y. (2019). Dynamic genetic regulation of gene expression during cellular differentiation. *Science* *364*, 1287-1290. 10.1126/science.aaw0040.
- Sur, I.K., Hallikas, O., Vaharautio, A., Yan, J., Turunen, M., Enge, M., Taipale, M., Karhu, A., Aaltonen, L.A., and Taipale, J. (2012). Mice lacking a Myc enhancer that includes human SNP rs6983267 are resistant to intestinal tumors. *Science* *338*, 1360-1363. 10.1126/science.1228606.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* *6*, 127-135. 10.1038/nri1781.
- Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S., and Anderson, G. (2017). Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat Rev Immunol* *17*, 295-305. 10.1038/nri.2017.12.
- Thakore, P.I., D'Ippolito, A.M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N.K., Kabadi, A.M., Reddy, T.E., Crawford, G.E., and Gersbach, C.A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods* *12*, 1143-1149. 10.1038/nmeth.3630.
- Thurman, R.E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M.T., Haugen, E., Sheffield, N.C., Stergachis, A.B., Wang, H., Vernot, B., et al. (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* *489*, 75-82. 10.1038/nature11232.
- Toft, N., Birgens, H., Abrahamsson, J., Griskevicius, L., Hallbook, H., Heyman, M., Klausen, T.W., Jonsson, O.G., Palk, K., Pruunsild, K., et al. (2018). Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *32*, 606-615. 10.1038/leu.2017.265.
- Treanor, L.M., Zhou, S., Janke, L., Churchman, M.L., Ma, Z., Lu, T., Chen, S.C., Mullighan, C.G., and Sorrentino, B.P. (2014). Interleukin-7 receptor mutants initiate early T cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential. *J Exp Med* *211*, 701-713. 10.1084/jem.20122727.
- van der Weyden, L., Adams, D.J., and Bradley, A. (2002). Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* *11*, 133-164. 10.1152/physiolgenomics.00074.2002.
- van der Wijst, M.G.P., Brugge, H., de Vries, D.H., Deelen, P., Swertz, M.A., LifeLines Cohort, S., Consortium, B., and Franke, L. (2018). Single-cell RNA sequencing identifies celltype-specific cis-eQTLs and co-expression QTLs. *Nat Genet* *50*, 493-497. 10.1038/s41588-018-0089-9.
- Vanhille, L., Griffon, A., Maqbool, M.A., Zacarias-Cabeza, J., Dao, L.T., Fernandez, N., Ballester, B., Andrau, J.C., and Spicuglia, S. (2015). High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. *Nat Commun* *6*, 6905. 10.1038/ncomms7905.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* *339*, 1546-1558. 10.1126/science.1235122.
- Wakabayashi, Y., Inoue, J., Takahashi, Y., Matsuki, A., Kosugi-Okano, H., Shinbo, T., Mishima, Y., Niwa, O., and Kominami, R. (2003a). Homozygous deletions and point mutations of the *Rit1/Bcl11b* gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* *301*, 598-603. 10.1016/s0006-291x(02)03069-3.
- Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., et al. (2003b). *Bcl11b* is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol* *4*, 533-539. 10.1038/ni927.
- Weber, J., Braun, C.J., Saur, D., and Rad, R. (2020). In vivo functional screening for systems-level integrative cancer genomics. *Nat Rev Cancer* *20*, 573-593. 10.1038/s41568-020-0275-9.

- Weber, J., de la Rosa, J., Grove, C.S., Schick, M., Rad, L., Baranov, O., Strong, A., Pfau, A., Friedrich, M.J., Engleitner, T., et al. (2019). PiggyBac transposon tools for recessive screening identify B-cell lymphoma drivers in mice. *Nat Commun* *10*, 1415. 10.1038/s41467-019-09180-3.
- Wei, G., Abraham, B.J., Yagi, R., Jothi, R., Cui, K., Sharma, S., Narlikar, L., Northrup, D.L., Tang, Q., Paul, W.E., et al. (2011). Genome-wide analyses of transcription factor GATA3-mediated gene regulation in distinct T cell types. *Immunity* *35*, 299-311. 10.1016/j.immuni.2011.08.007.
- Wenzinger, C., Williams, E., and Gru, A.A. (2018). Updates in the Pathology of Precursor Lymphoid Neoplasms in the Revised Fourth Edition of the WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Curr Hematol Malig Rep* *13*, 275-288. 10.1007/s11899-018-0456-8.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* *153*, 307-319. 10.1016/j.cell.2013.03.035.
- Xie, S., Duan, J., Li, B., Zhou, P., and Hon, G.C. (2017). Multiplexed Engineering and Analysis of Combinatorial Enhancer Activity in Single Cells. *Mol Cell* *66*, 285-299 e285. 10.1016/j.molcel.2017.03.007.
- Xiong, N., Kang, C., and Raulet, D.H. (2002). Redundant and unique roles of two enhancer elements in the TCRgamma locus in gene regulation and gammadelta T cell development. *Immunity* *16*, 453-463. 10.1016/s1074-7613(02)00285-6.
- Yu, Y., and Bradley, A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* *2*, 780-790. 10.1038/35093564.
- Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B.D., et al. (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* *515*, 355-364. 10.1038/nature13992.
- Zamisch, M., Moore-Scott, B., Su, D.M., Lucas, P.J., Manley, N., and Richie, E.R. (2005). Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol* *174*, 60-67. 10.4049/jimmunol.174.1.60.
- Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., et al. (2011). Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* *43*, 932-939. 10.1038/ng.924.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., et al. (2012). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *481*, 157-163. 10.1038/nature10725.
- Zhang, J., Lee, D., Dhiman, V., Jiang, P., Xu, J., McGillivray, P., Yang, H., Liu, J., Meyerson, W., Clarke, D., et al. (2020). An integrative ENCODE resource for cancer genomics. *Nat Commun* *11*, 3696. 10.1038/s41467-020-14743-w.
- Zhou, H.Y., Katsman, Y., Dhaliwal, N.K., Davidson, S., Macpherson, N.N., Sakthidevi, M., Collura, F., and Mitchell, J.A. (2014). A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes Dev* *28*, 2699-2711. 10.1101/gad.248526.114.
- Zurbier, L., Gutierrez, A., Mullighan, C.G., Cante-Barrett, K., Gevaert, A.O., de Rooi, J., Li, Y., Smits, W.K., Buijs-Gladdines, J.G., Sonneveld, E., et al. (2014). Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. *Haematologica* *99*, 94-102. 10.3324/haematol.2013.090233.

12. Publikationen, die im Rahmen der Doktorarbeit entstanden sind

PiggyBac transposon tools for recessive screening identify B-cell lymphoma drivers in mice. Weber, J.*, de la Rosa, J., Grove, CS., Schick, M., Rad, L., Baranov, O., Strong, A., Pfaus, A., Friedrich, MJ., Engleitner, T., **Lersch, R.**, Öllinger, R., Grau, M., Menendez, IG., Martella, M., Kohlhofer, U., Banerjee, R., Turchaninova, MA., Scherger, A., Hoffman, GJ., Hess, J., Kuhn, LB., Ammon, T., Kim, J., Schneider, G., Unger, K., Zimmer-Strobl, U., Heikenwälder, M., Schmidt-Supprian, M., Yang, F., Saur, D., Liu, P., Steiger, K., Chudakov, DM., Lenz, G., Quintanilla-Martinez, L., Keller, U., Vassiliou, GS., Cadiñanos, J., Bradley, A., Rad, R. Nat Commun. 2019 Mar 29;10(1):1415. doi: 10.1038/s41467-019-09180-3.

In vivo interrogation of regulatory genomes reveals extensive quasi-insufficiency in cancer evolution. Fischer, A.*, **Lersch, R.***, de Andrade Krätzig, N., Strong, A., Friedrich, M., Weber, J., Engleitner, T., Öllinger, R., Yen, H.Y., Kohlhofer, U., Gonzalez-Menendez, I., Sailer, D., Kogan, L., Lahnalampi, M., Laukkanen, S., Kaltenbacher, T., Klement, C., Rezeai, M., Ammon, T., Montero, J.J., Schneider, G., Mayerle, J., Heikenwalder, M., Schmidt-Supprian, M., Quintanilla-Martinez, M., Steiger, K., Liu, P., Cadiñanos, J., Vassiliou, G., Saur, D., Lohi, O., Heinäniemi, M., Conte, N., Bradley, A., Rad, L., Rad, R. Cell Genom. 2023 Mar 8; 3(3):100276. doi: 10.1016/j.xgen.2023.100276.

*Erstautor

13. Preise im Rahmen der Doktorarbeit

2018 Preis für den besten Vortrag bei dem **Symposium der Deutschen Krebshilfe**. Titel: „PiggyBac transposon screening identifies novel genes and regulatory elements in T cell leukemia“.

14. Stipendien im Rahmen der Doktorarbeit

WS 2017/2018 **Deutsche Krebshilfe (DKH)**, Mildred-Scheel- Doktorandenprogramm

Sep 2018 – Sep 2019 **Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)**, SFB 1243, einjähriges Stipendium für Nachwuchswissenschaftler

15. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Rad aufrichtig dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem Projekt zu arbeiten und mir immer bezüglich dieser Arbeit aber auch anderen Belangen zu Rate stand. Nur durch seine Supervision konnte dieses Projekt realisiert werden. Er hat mich in die experimentelle Medizin eingeführt und dank ihm habe ich ein großes Interesse hierfür entwickelt und mich dazu entschieden, auch weiterhin wissenschaftlich tätig zu sein.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Dieter Saur für die Unterstützung sowie auch hilfreichen Diskussionen bedanken, die mir bei der Realisation der Arbeit geholfen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Kollegin Anja Fischer für die Unterstützung und vor allem Geduld bedanken, die sie in mich investiert hat. Ohne sie wäre es nicht zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit gekommen. In diesem Sinne möchte ich mich auch insbesondere bei Dr. Julia Weber bedanken, die mich in die Laborarbeit eingeführt und mich immer unterstützt hat.

Zudem möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Rad und insbesondere Sebastian Widholz, Thorsten Kaltenbacher und Roman Maresch dafür bedanken, dass diese mich zu jederzeit bei der Durchführung der verwendeten Methoden geduldig unterstützt haben und auch für die tolle Arbeitsatmosphäre!

Außerdem möchte ich mich bei Rupert Öllinger für die wissenschaftliche Anleitung, bei Katja Steiger für Ihre Hilfe in Bezug zur Mauspathologie, bei Thomas Engleitner und Niklas de Andrade Krätzig für ihre bioinformatischen Analysen und bei Julia Eichinger und Anja Seeman für die technische Unterstützung bedanken.

Auch gilt mein Dank Prof. Dr. Roland Schmid für die Möglichkeit in der II. Medizinischen Klinik des Rechts der Isar zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer den nötigen Rückhalt gibt und mich zu jederzeit unterstützt und insbesondere meiner Freundin Clara für ihre Geduld und für ihre grenzenlose Unterstützung seit Beginn des Studiums.