

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Funktionelle Bedeutung und klinische Relevanz
der langen nicht-kodierenden RNA *HOXA10-AS*
in Akuten Myeloischen Leukämien**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
für das Fachgebiet
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sina Al-Kershi
geboren am 14.09.1993 in Weimar

Betreuer: Herr Prof. Dr. Jan-Henning Klusmann
Gutachterin: Frau Jun. Prof. Dr. Monika Hämmerle
Gutachter: Herr Prof. Dr. Rolf Marschalek, Frankfurt

03.11.2020

26.04.2021

Referat

Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige Charakterisierung der langen nicht-kodierenden Ribonukleinsäure (lncRNA) *HOXA10-AS* im Kontext der Hämatopoese und Leukämogenese. Dazu wurden mittels qRT-PCR Expressionsprofile der lncRNA und ihrer Nachbargene in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellpopulationen und in AML-Zelllinien erstellt. Des Weiteren wurden mittels lentiviraler Vektoren unterschiedliche *gain*- und *loss of function* Experimente in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, in AML-Zelllinien und humanen Patientenblasten durchgeführt und infolgedessen die Differenzierung und die Proliferation untersucht. In Hinblick auf eine klinische Anwendung der Erkenntnisse wurde die Herunterregulierung von *HOXA10-AS* in Patientenblasten im nächsten Schritt *in vivo* im Mausmodell erprobt. Neben der funktionellen Charakterisierung erfolgten Untersuchungen zum Funktionsmechanismus der lncRNA mittels qRT-PCR, Microarray-Genexpressionsanalyse und Signaltransduktionsassays.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass *HOXA10-AS* in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und in akuter myeloischer Leukämie mit *KMT2A*-Rearrangements (*KMT2A-r* AML) hoch exprimiert wird. Die ektope Überexpression von *HOXA10-AS* beeinträchtigte die physiologische monozytäre Differenzierung in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Mittels shRNA- und LNA-GapmeR-vermittelter Herunterregulierung und CRISPR/Cas9-vermittelter Exzision sowie lentiviraler Überexpression konnte zudem gezeigt werden, dass *HOXA10-AS* eine onkogene Rolle in der Pathogenese von *KMT2A-r* AML ausübt. Im Mausmodell führte die Behandlung von humanen *KMT2A-r* Patientenblasten mit shRNAs gegen *HOXA10-AS* zu einer deutlichen Reduktion der leukämischen Proliferation. Als Funktionsmechanismus der zytoplasmatisch lokalisierten lncRNA konnte eine Wirkung auf die Nachbargene *HOXA10* und mir-196b ausgeschlossen und eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs nachgewiesen werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die lncRNA *HOXA10-AS* eine wichtige Rolle in der Homöostase der gesunden Hämatopoese spielt und eine onkogene Funktion in der Aufrechterhaltung von *KMT2A-r* AML ausübt. Daher stellt *HOXA10-AS* eine potentielle Zielstruktur für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien für die Behandlung von *KMT2A-r* AML dar.

Al-Kershi, Sina: Funktionelle Bedeutung und klinische Relevanz der langen nicht-kodierenden RNA *HOXA10-AS* in Akuten Myeloischen Leukämien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Thema der Dissertation	1
1.2	Akute Myeloische Leukämie	1
1.3	AML mit <i>KMT2A</i> -Rearrangements	2
1.4	<i>HOX</i> -Gene	4
1.5	lncRNAs	6
1.6	lncRNAs innerhalb der <i>HOX</i> -Cluster	8
1.7	Genomischer Locus der lncRNA <i>HOXA10-AS</i>	8
2	Zielstellung	10
3	Material und Methodik	11
3.1	Zellkultur	11
3.1.1	Zelllinien	11
3.1.2	Hämatopoetische Zellen	11
3.1.3	AML-Patientenblasten	12
3.2	Hämatopoetischer Differenzierungsassay	13
3.3	Molekularbiologische Verfahren	14
3.3.1	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real time-PCR	14
3.3.2	Zelluläre Fraktionierung	15
3.4	Klonierung	15
3.4.1	Klonierung LBid- <i>HOXA10-AS</i> :GFP	15
3.4.2	Klonierung pLKO5d.SFFV.eGFP.miR30n-sh <i>HOXA10-AS</i>	17
3.4.3	Klonierung SGL40C.CRISPR.EFS.GFP-dual-sg <i>HOXA10-AS</i>	18
3.5	Herstellung lentiviraler Partikel	18
3.6	Transduktion	19
3.7	LNA-GapmeRs	19
3.8	Signaltransduktionsassays	19
3.9	Mausexperimente	20
3.10	Microarray-Genexpressionsanalyse	20
3.11	Durchflusszytometrie	20
3.12	Statistische Auswertung	21
3.13	Weitere Materialien	21

3.13.1	Übersicht der qRT-PCR Primer	21
3.13.2	Übersicht der Sequenzierungsprimer	22
3.13.3	Übersicht der Zielsequenzen der <i>loss of function</i> Versuche	22
3.13.4	Weitere Labormaterialien	22
3.13.5	Geräte	23
4	Ergebnisse	25
4.1	<i>HOXA10-AS</i> in der Hämatopoese	25
4.1.1	Expressionsprofil der Gene des <i>HOXA10-AS</i> Locus während der Hämatopoese	25
4.1.2	Einfluss der <i>HOXA10-AS</i> Überexpression auf die monozytäre Differenzierung	27
4.2	<i>HOXA10-AS</i> in der Leukämogenese	30
4.2.1	Expressionsprofil der Gene des <i>HOXA10-AS</i> Locus in zytogenetischen AML-Subtypen	30
4.2.2	Einfluss der <i>HOXA10-AS</i> Überexpression auf die Leukämogenese	32
4.2.3	Einfluss der <i>HOXA10-AS</i> Herunterregulierung auf die Leukämogenese	34
4.3	Funktionsmechanismus der lncRNA <i>HOXA10-AS</i>	38
4.4	<i>In vivo</i> Anwendung der <i>HOXA10-AS</i> Herunterregulierung	44
5	Diskussion	46
5.1	<i>HOXA10-AS</i> in der Hämatopoese	46
5.2	<i>HOXA10-AS</i> in der Leukämogenese	47
5.3	Funktionsmechanismus von <i>HOXA10-AS</i>	48
5.4	Klinische Relevanz von <i>HOXA10-AS</i>	53
6	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	57
	Thesen	67
	Anlagen	68
	Anhänge	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BFU-E	burst-forming unit erythroid
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CD4-TC	CD4-T-Zellen
CD8-TC	CD-8-T-Zellen
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	colony-forming unit erythroid
CFU-G/M	colony-forming unit granulocytic/monocytic
CMP	common myeloid progenitor
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELN	European Leukemia Net
Ery	Erythrozyten
FAB	French-American-British
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
fwd	forward
GC	Granulozyten
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	granulocyte-macrophage progenitor
HK	Housekeeping-Gen
HOX	Homeobox
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
KMT2A	Lysin Methyltransferase 2A
KMT2A-PTD	KMT2A-partielle Tandemduplikation

KMT2A-r	KMT2A-rearrangiert
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA
LNA	locked nucleic acid
MEP	megakaryocyte-erythroid progenitor
miR	microRNA
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Mk	Megakaryozyten
MLL	mixed lineage leukemia
Mono	Monozyten
mRNA	messengerRNA
NKC	natürliche Killerzellen
NSG	NOD scid gamma
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDX	patient-derived xenografts
PEI	Polyethylenimine
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PTD	partielle Tandemduplikation
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rev	reverse
SCF	Stem cell factor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
sgRNA	single guide RNA
shRNA	small hairpin RNA
t-AML	Therapie-assoziierte AML
TPO	Thrombopoietin
u.a.	unter anderem
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Nomenklatur

Den gängigen Konventionen entsprechend wird in der vorliegenden Arbeit folgende Formatierung für die jeweiligen Gen- bzw. Transkriptnamen verwendet:

proteinkodierende Gene:

- Gen: *HOXA10*
- Protein: HOXA10

lange nicht-kodierende RNA (lncRNA):

- Gen: *HOXA10-AS*
- lncRNA: *HOXA10-AS*

microRNA:

- Gen: mir-196b
- miRNA: miR-196b

Inanspruchnahme von experimentellen Daten

Experimente dieser Arbeit sind zu großen Teilen in der Originalpublikation „The stem cell-specific long noncoding RNA HOXA10-AS in the pathogenesis of KMT2A-rearranged leukemia. Blood Adv 2019 Dec 23;3(24):4252-4263“ [1] veröffentlicht (s. Anlage).

In dieser Dissertation werden ausschließlich Daten von Experimenten verwendet, an deren Planung, Durchführung, Auswertung und Interpretation ich direkt beteiligt war. Folgende Abbildungen enthalten Daten von Experimenten, bei denen ich zusätzliche Unterstützung aus meiner Arbeitsgruppe erhalten habe: In Abb. 18 und 21 ist jeweils eins der Replikate durch Dr. Raj Bhayadia durchgeführt worden. In Abb. 25-26 sind jeweils eines der Replikate sowie alle qRT-PCRs für HOXA9 durch Michelle Ng durchgeführt worden. Die Einzellzellklone für Abb. 26 wurden von Lonneke Verboon gewonnen. Die bioinformatische Analyse der Microarray-Rohdaten (s. Abbildung 28) wurde von Dr. Adrian Schwarzer durchgeführt. Die experimentelle Ausführung für Abb. 29 erfolgte durch Dr. Raj Bhayadia. Für Abb. 31 wurden die Versuche mit BMS-345541 von Lonneke Verboon durchgeführt.

1. Einleitung

1.1 Thema der Dissertation

In Deutschland erkranken jährlich über 4000 Menschen an Akuter Myeloischer Leukämie (AML), womit die AML ca. 20% aller Leukämieerkrankungen ausmacht [2]. Trotz der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Therapieschemata sind die Überlebensraten von AML-Patienten weiterhin gering: Bei an AML erkrankten Kindern werden 5-Jahresüberlebensraten von ca. 70% erzielt, [3] während erwachsene AML-Patienten lediglich eine durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate von ca. 20% erreichen [4]. Ein Grund für die weiterhin schlechten Therapieergebnisse bei AML ist der bislang unzureichende Transfer neuer Erkenntnisse über die ursächlichen molekulargenetischen Veränderungen in zielgerichtete therapeutische Verfahren.

Thema dieser Arbeit ist die erstmalige Charakterisierung der langen nicht-kodierenden RNA (lncRNA) *HOXA10-AS* im Kontext der Hämatopoese und der Pathogenese der AML.

1.2 Akute Myeloische Leukämie

AML entsteht durch Mutationen auf Ebene der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Bei diesen Mutationen kann es sich sowohl um numerische oder strukturelle zytogenetische Aberrationen als auch um Punktmutationen handeln. Die genetischen Veränderungen resultieren in einer dysregulierten, gesteigerten Proliferation der hämatopoetischen Progenitoren und in einem Block der weiteren Differenzierung. Durch die massive Ausbreitung der Blasten kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark, was schwere Defizite der Immunabwehr, der Blutgerinnung und des Sauerstofftransports zur Folge hat. [5]

Die individuellen Charakteristika der AML-Blasten, bestehend aus (zyto-) genetischen und morphologischen Merkmalen, beeinflussen maßgeblich das klinische Erscheinungsbild der AML und damit die Prognose der Patienten. Dementsprechend ist es sinnvoll, die Gruppe der AML-Erkrankungen anhand bestimmter Kriterien zu unterteilen und damit eine risikoadaptierte Therapieentscheidung zu treffen. Zur Klassifikation der AML werden im klinischen Kontext sowohl die French-American-British -(FAB-) Klassifikation als auch die World Health Organization- (WHO-) Klassifikation herangezogen. Die FAB-Klassifikation, die bereits 1976 eingeführt wurde, teilt die AML anhand der Morphologie der AML-Blasten in die Subtypen M0-M7 ein [6]. Die WHO-Klassifikation hingegen berücksichtigt zur

Einteilung der AML zytogenetische und molekulargenetische Kriterien [7]. Das Expertengremium European LeukemiaNet (ELN) empfiehlt basierend auf der WHO-Klassifikation eine prognostische Risikostratifizierung in drei Gruppen (günstige/intermediäre/ungünstige Prognose), die anhand genetischer Kriterien getroffen wird [8].

Im Gegensatz zu vielen anderen malignen Erkrankungen tritt die AML in allen Altersklassen auf [2,9]. Das Spektrum der genetischen Veränderungen der pädiatrischen AML weicht dabei deutlich vom Mutationsspektrum der adulten AML ab [10]. Bei Kindern mit AML finden sich häufiger chromosomale Aberrationen und seltener ein normaler Karyotyp als bei Erwachsenen [11-13]. Zudem sind die bei der adulten AML häufig mutierten Gene (*NPM1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *TP53*) bei Kindern wesentlich seltener betroffen. Andere Gene, wie z.B. *FLT3* oder *GATA2* unterscheiden sich hinsichtlich der genauen Lokalisation und Frequenz der Mutationen in pädiatrischer und adulter AML. [10]

1.3 AML mit *KMT2A*-Rearrangements

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Rolle von *HOXA10-AS* in der Entstehung der AML mit *KMT2A*-Rearrangements (*KMT2A-r* AML).

Der frühere Name des *KMT2A* Gens – Mixed lineage leukemia (*MLL*) – leitet sich aus der Tatsache ab, dass Aberrationen dieses Gens sowohl bei Patienten mit AML als auch bei Patienten mit ALL häufig vorhanden sind [14]. Mit einer Frequenz von 16-18% sind *KMT2A*-Rearrangements die häufigste zytogenetische Aberration bei pädiatrischer AML [10-12,15]. Besonders oft finden sich *KMT2A*-Aberrationen bei AML und ALL im Säuglingsalter [11,16,17]. Bei Erwachsenen stellt die *KMT2A-r* AML mit unter 5% aller AML-Erkrankungen einen selteneren Subtyp dar [18].

Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen sind *KMT2A*-Aberrationen mit einer vergleichsweise schlechten Prognose assoziiert. Pädiatrische Patienten mit *KMT2A-r* AML erreichen je nach Fusionspartner des *KMT2A* Gens ein Fünfjahresüberleben von nur 33 bis 61% (ungünstige bis intermediäre Prognose) [12,15,19]. Erwachsene AML-Patienten mit dem häufigsten *KMT2A*-Rearrangement t(9;11) haben eine intermediäre Prognose, wohingegen alle anderen *KMT2A*-Aberrationen bei adulter AML einen ungünstigen Prognosefaktor darstellen [8].

KMT2A-Rearrangements treten bei Säuglingen, die an AML erkranken, bereits zuvor *in utero* auf [20,21]. Bei erwachsenen Patienten finden sich *KMT2A*-Rearrangements häufig

bei therapie-assoziiertes AML (t-AML) nach vorheriger Chemotherapie mit DNA-Topoisomerase-II-Inhibitoren, wie z.B. Etoposid [22]. Der Verzehr von Flavonoiden, die als natürliche DNA-Topoisomerase-II-Inhibitoren wirken, während der Schwangerschaft gilt als Risikofaktor für die Entstehung von *KMT2A*-r AML bei Säuglingen [23].

KMT2A-r AML manifestiert sich bei Kindern in einem signifikant jüngeren Alter als andere AML-Formen und auch die t-AML mit *KMT2A*-Rearrangements bei Erwachsenen tritt mit wesentlich kürzerer Latenzzeit auf, als t-AML mit anderen genetischen Charakteristika [12,22]. Der Grund für diese kurze Entstehungszeit ist die außergewöhnlich niedrige Rate an zusätzlichen kooperierenden Mutationen, die in der Leukämogenese der *KMT2A*-r Leukämien benötigt werden [13,24].

Das Gen *KMT2A* liegt auf Chromosom 11q23 und kodiert für die Methyltransferase KMT2A, die zur Gruppe der Trithoraxproteine zählt. Im physiologischen Zustand führt das Protein KMT2A mittels Histonmethylierung an Histon 3 Lysin 4 (H3K4) zur gezielten Aktivierung der Expression bestimmter Gene während der Entwicklung. [25,26] *KMT2A* besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten: Das N-terminale Fragment erkennt und bindet spezifische DNA-Sequenzen, wohingegen das C-terminale Fragment die SET-Domäne (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax-Domäne) enthält, die als Methyltransferase wirkt [25].

Die für diese Arbeit relevanten *KMT2A*-Aberrationen im Zusammenhang mit AML sind Translokationen und partielle Tandemduplikationen (PTD) des *KMT2A* Gens. *KMT2A*-PTD entstehen durch eine in-frame Wiederholung von Exonen und führen zu einer verstärkten Aktivität des Gens (*gain of function*). Die bei pädiatrischer AML häufigeren *KMT2A*-Translokationen entstehen durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen. [27] Dabei kommt es zur Fusion des N-Terminus des *KMT2A* Gens mit einem Translokationspartner. Derzeit sind über 90 verschiedene Fusionspartner in der Genese der *KMT2A*-r AML bekannt. [28] Obwohl die *KMT2A* Fusionsgene aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen Fusionspartner eine sehr heterogene Gruppe darstellen, führen die meisten der bislang bekannten *KMT2A* Translokationen zu einem identischen dysregulierten Expressionsprogramm bestimmter Zielgene und damit zur leukämischen Transformation [29]. Eine Gruppe von Genen, deren Transkription besonders stark durch Wildtyp-*KMT2A* und *KMT2A*-Fusionen beeinflusst wird, ist die Familie der *HOX*-Gene [30].

1.4 *HOX*-Gene

Die hochkonservierten Homeobox- (*HOX*-) Gene kodieren für eine Gruppe von 39 Transkriptionsfaktoren und sind in vier verschiedenen Clustern (*HOXA-D*) auf vier unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert [31]. Mittels eines komplexen, streng kontrollierten Expressionsprogramms innerhalb eines Clusters regulieren die *HOX*-Gene den zeitlichen und räumlichen Ablauf der Extremitätenentwicklung und die Entwicklung der Organe entlang der anterior-posterior Achse während der Embryogenese [32,33].

In der Hämatopoese werden die *HOX*-Gene analog zur Embryonalentwicklung in einem hochspezifischen Muster exprimiert. Die Expressionslevel der *HOX*-Gene sind in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und frühen Vorläuferzellen am höchsten und sinken während der hämatopoetischen Differenzierung, bis in den differenzierten CD34⁻ Zellen des Knochenmarks praktisch keine Expression der *HOX*-Gene mehr nachweisbar ist. (**s. Abbildung 1**) [34]

Innerhalb der Population der frühen CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC) werden die anterioren 3' *HOX*-Gene (*HOX1-6*) besonders hoch in den primitiven HSC exprimiert und im Verlauf herunterreguliert, während die posterioren 5' *HOX*-Gene (*HOX7-13*) erst in den etwas weiter differenzierten, frühen Vorläuferzellen hoch exprimiert werden [35]. Die Überexpression von *HOX*-Genen in Mausmodellen führt zur Proliferation von HSPC und zu einem Block der hämatopoetischen Differenzierung [36,37].

Zusätzlich zu dieser zeitlichen Spezifität findet auch eine Linien-spezifische Expression der *HOX*-Gene statt: Die verschiedenen *HOX*-Cluster werden jeweils in unterschiedlichen hämatopoetischen Reihen exprimiert. So findet sich eine hohe Expression der *HOXA*-Gene in myeloischen Vorläuferzellen, wohingegen die *HOXB*-Gene hauptsächlich in der erythroiden Reihe und die *HOXC*-Gene vorwiegend in der lymphatischen Reihe exprimiert werden [38].

Die Anordnung der *HOX*-Gene in Clustern ermöglicht die gezielte Koordination ihrer Expression durch Chromatinmodifikationen. Als wichtiger chromatinmodifizierender Regulator der regelrechten *HOX* Expression während der Embryogenese und Hämatopoese gilt KMT2A. Ein *Kmt2a*-Knockout führt in Mausmodellen zu einer stark verminderten Expression der *Hox*-Gene und infolgedessen zu einer drastischen Reduktion der Anzahl an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen [39,40]. Die strenge Kontrolle der *HOX* Expression durch KMT2A ist folglich essentiell für die normale hämatopoetische

Differenzierung. Demgegenüber führen *KMT2A*-Aberrationen zu Störungen der *HOX* Regulation und damit zu schweren Defekten der Hämatopoese. Im physiologischen Zustand bindet *KMT2A* an die Promotoren der *HOX*-Gene und aktiviert mittels H3K4-Methylierung die *HOX* Transkription in den frühen Stadien der Hämatopoese [41]. (s. **Abbildung 1**)

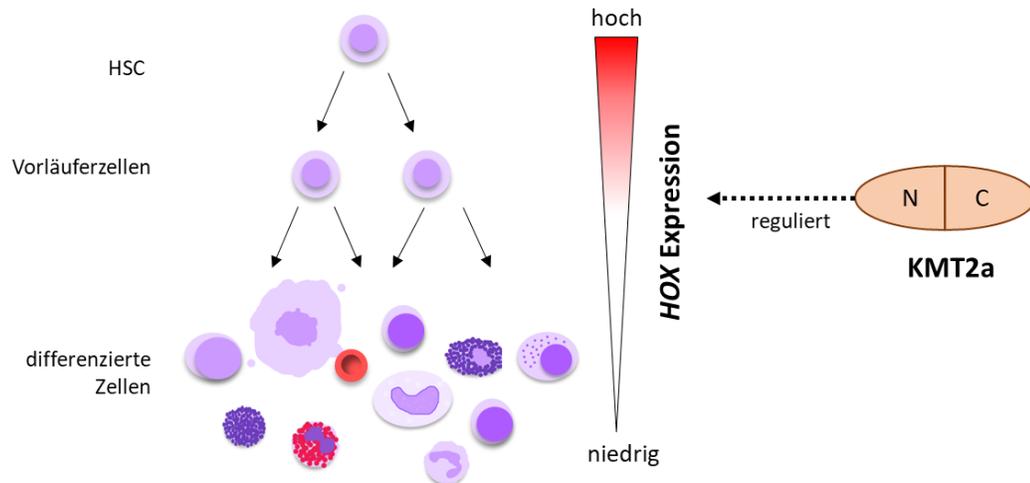


Abbildung 1: Physiologische Expression der *HOX*-Gene in der Hämatopoese durch *KMT2A*

Im Rahmen von *KMT2A*-Fusionen bleibt das N-terminale *KMT2A* Fragment, das für die Erkennung und Bindung von DNA-Sequenzen verantwortlich ist, erhalten, wohingegen die C-terminale SET-Domäne, die die physiologische Methyltransferaseaktivität ausübt, verloren geht [26,42]. Dafür rekrutieren die Fusionspartner Proteinkomplexe wie z.B. DOT1L oder PRMT1, die ihrerseits als Methyltransferasen wirken [43,44]. DOT1L führt dabei zu einer H3K79 Histonmethylierung und PRMT1 bewirkt eine H4R3 Histonmethylierung [44,45]. Infolge dieser abnormen Chromatinmodifikationen durch die *KMT2A*-Fusionspartner kommt es zur verstärkten und veränderten transkriptionellen Aktivierung der *HOX*-Gene [43,44].

Eine weitere Art von *KMT2A*-Aberrationen, die zur Leukämogenese führen, sind *KMT2A*-PTD. Bei *KMT2A*-PTD bleibt die C-terminale SET-Domäne erhalten. Die Verdopplung von Exonen im Rahmen der PTD bewirkt jedoch eine erhöhte Aktivität der Methyltransferase *KMT2A* (*gain of function*) und damit eine gesteigerte H3K4 Methylierung von *HOX*-Promotoren [46].

Die Dysregulation der *HOX*-Gene durch *KMT2A*-Fusionen oder *KMT2A*-PTD führt zu einer gesteigerten Proliferation von unreifen hämatopoetischen Zellen und zu einem Block der

Differenzierung und trägt damit zur Leukämogenese bei [47,48]. (s. **Abbildung 2**) Demzufolge handelt es sich bei den *HOX*-Genen um Onkogene.

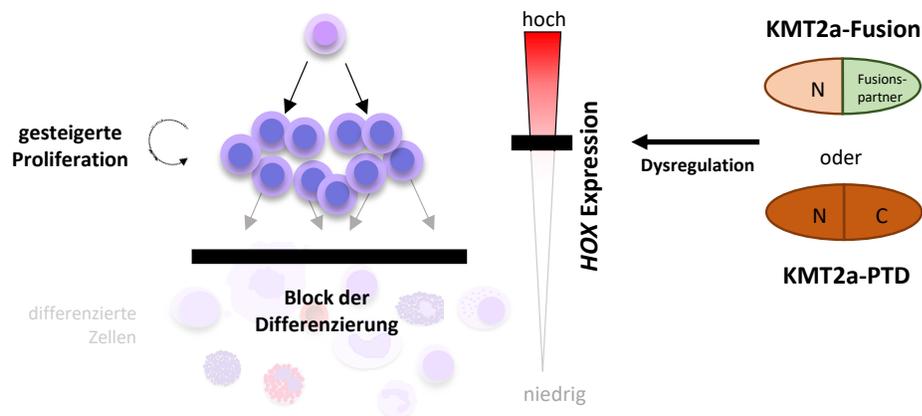


Abbildung 2: Ektote Expression der *HOX*-Gene infolge *KMT2A*-Aberrationen bei AML

Die Expression von *HOX*-Genen gilt zudem als wichtiger prognostischer Faktor der AML. Sowohl hohe globale Expressionslevel der *HOX*-Gene, als auch eine Überexpression bestimmter einzelner *HOX*-Gene, wie z.B. *HOXA9* und *HOXA4*, sind mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert [49-51]. Eine verminderte *HOX* Expression findet sich hingegen bei AML-Patienten mit einer günstigen Prognose [52].

Innerhalb der *HOX*-Cluster befinden sich zahlreiche Gensequenzen, die für lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) und microRNAs kodieren. Diese RNAs üben vielfältige Funktionen aus und tragen damit zum komplexen Regulationsmechanismus der *HOX*-Gene während der Hämatopoese und Leukämogenese bei.

1.5 lncRNAs

Über viele Jahrzehnte standen lediglich Proteine im Fokus der Genetik und es galt das Paradigma: DNA wird zu RNA transkribiert, RNA wird in ein Protein translatiert und das Protein führt zelluläre Funktionen aus. Allerdings kodieren lediglich 2% des menschlichen Genoms für Proteine [53]. Die restlichen, nicht-kodierenden Abschnitte des Genoms wurden lange Zeit als „evolutionärer Müll“ betrachtet. Die Entdeckung, dass rund Dreiviertel des Genoms, also ein wesentlich größerer Anteil als nur die proteinkodierenden Sequenzen, transkribiert werden, hat zu einer grundlegenden wissenschaftlichen Revolution geführt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des menschlichen Genoms in nicht-

kodierende RNAs übersetzt wird, die selbst wichtige biologische Funktionen innerhalb der Zelle ausüben [54]. Die heterogene Klasse der nicht-kodierenden RNA umfasst u.a. lncRNAs und kurze nicht-kodierende RNAs wie microRNAs [55].

lncRNAs bilden die größte Gruppe aller nicht-kodierenden RNAs und machen rund zwei Drittel des gesamten menschlichen Transkriptoms aus [56]. Als lncRNAs werden alle nicht-kodierenden RNAs definiert, die länger als 200 Basenpaare sind. lncRNAs kommen in allen Spezies vor, sind jedoch in geringerem Ausmaß konserviert als proteinkodierende Gene. Viele lncRNAs werden zudem spezifisch in Primaten exprimiert [57]. Es wird daher postuliert, dass sich komplexe Organismen eher aufgrund der Menge und Vielfalt der nicht-kodierenden RNAs entwickeln konnten, als aufgrund von unterschiedlichen proteinkodierenden Genen [58]. Ebenso wie mRNAs werden lncRNAs von der RNA Polymerase II transkribiert und in den meisten Fällen am 5' Ende gecappt, gespleißt und polyadenyliert [59]. Die Transkription von lncRNAs wird dabei ebenso durch Histonmodifikationen reguliert [57]. Im Vergleich zu proteinkodierenden Genen sind die Expressionslevel von lncRNAs insgesamt niedriger, jedoch spezifischer für unterschiedliche Differenzierungsstufen und unterschiedliche Gewebetypen [57].

lncRNAs sind in zahlreiche essentielle zelluläre Prozesse involviert: So sind lncRNAs an der genomischen Prägung (*genomic imprinting*) von Genen [60] und an der Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen Zellen [61] beteiligt und regulieren zudem die Genexpression auf der Ebene der Chromatinkonfiguration [62-64], der Transkription [65] und der post-transkriptionellen Prozessierung [66]. Dadurch spielen lncRNAs nicht nur in physiologischen Vorgängen, wie der Entwicklung und Differenzierung, eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Entstehung von Krankheiten [67,68]. Überexpression, Mutationen und Herunterregulation von lncRNAs finden sich bei zahlreichen malignen Erkrankungen [69], aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen [70], kongenitalen Syndromen [71] und Stoffwechselerkrankungen [72].

Von besonderer Relevanz für die vorliegende Arbeit sind die Prozesse der Hämatopoese und der Leukämogenese. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass in unterschiedlichen physiologischen hämatopoetischen Differenzierungsstufen und Zellreihen und in verschiedenen zytogenetischen AML-Subgruppen jeweils spezifische lncRNA-Muster exprimiert werden [73].

1.6 lncRNAs innerhalb der *HOX*-Cluster

In den *HOX*-Clustern sind neben den proteinkodierenden Genen auch Gene für hunderte lncRNAs lokalisiert. Diese *HOX*-lncRNAs werden während der Differenzierung im selben räumlich und zeitlich spezifischen Muster exprimiert, wie die benachbarten proteinkodierenden Gene. [74] Die ungewöhnlich hohe Dichte an lncRNAs innerhalb der *HOX*-Cluster und die Tatsache, dass die sequentielle *HOX* Genexpression präzise mittels epigenetischer Modifikationen koordiniert wird, legen nahe, dass *HOX*-lncRNAs möglicherweise als wichtige Regulatoren der Expression der proteinkodierenden *HOX*-Gene agieren. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung 2007 wurden mehrere *HOX*-lncRNAs funktionell charakterisiert, insbesondere *HOTAIR*, *HOTTIP* und *HOTAIRM1* [63,74-76]. Dabei konnte gezeigt werden, dass *HOX*-lncRNAs nicht nur die Expression von benachbarten und weiter entfernten *HOX*-Genen beeinflussen [63,74], sondern dass sie darüber hinaus auch wichtige Signalwege unabhängig von den *HOX*-Genen regulieren [77]. Eine aberrante Expression von *HOX*-lncRNAs konnte zudem in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden [78].

1.7 Genomischer Locus der lncRNA *HOXA10-AS*

Thema dieser Arbeit ist die erstmalige Charakterisierung der lncRNA *HOXA10-AS* im Kontext der Hämatopoese und der Leukämogenese. Das lncRNA Gen *HOXA10-AS* ist auf Chromosom 7p15.2 am posterioren Ende des *HOXA*-Clusters lokalisiert und liegt auf dem Antisense-Strang gegenüber dem proteinkodierenden Gen *HOXA10* und gegenüber dem Gen der microRNA miR-196b [79] (**s. Abbildung 3**). Dabei überlappt die Sequenz des 3' Endes von *HOXA10* mit dem 3' Ende von *HOXA10-AS*, während die komplette Sequenz von miR-196b komplementär zu einem Teil der *HOXA10-AS* Sequenz ist (**s. Abbildung 3**). Das Gen *HOXA10-AS* kann in drei verschiedene lncRNA-Isoformen transkribiert und prozessiert werden. Die in diesem Projekt untersuchte Isoform *HOXA10-AS-202*, bestehend aus drei Exonen, hat eine Gesamtlänge von 1161 Basenpaaren [79].

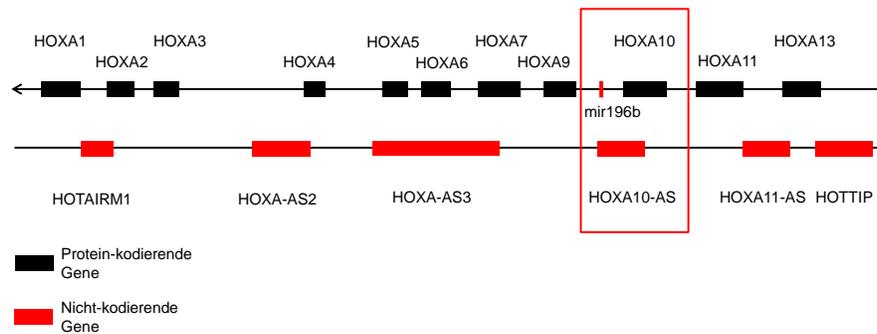


Abbildung 3: Genomischer Locus der lncRNA *HOXA10-AS* gegenüber der Onkogene *HOXA10* und mir-196b

Die der lncRNA gegenüberliegenden Gene, *HOXA10* und mir-196b, sind als wichtige Regulatoren der Hämatopoese bekannt und entscheidend an der Pathogenese von *KMT2A*-r AML beteiligt.

HOXA10 wird wie alle anderen *HOX*-Gene im physiologischen Zustand in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hoch exprimiert und während der Differenzierung herunterreguliert [80]. In akuten Leukämien wird *HOXA10* durch *KMT2A*-Aberrationen überexprimiert [30] und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [49,81].

Analog zu den benachbarten proteinkodierenden Genen ist auch die Expression von miR-196b in HSC am höchsten und sinkt während der hämatopoetischen Differenzierung [82,83]. Die Überexpression in HSPC *in vitro* führt ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation und einem partiellen Block der Differenzierung [82]. In akuten Leukämien findet sich eine miR-196b Überexpression in Subtypen mit *KMT2A*-Aberrationen [84] und in anderen Subtypen mit einer gesteigerten *HOX* Expression [85]. In Patienten mit AML ist die Überexpression von miR-196b als unabhängiger prognostischer Faktor mit einem schlechteren Outcome assoziiert [86,87].

2. Zielstellung

Die zeitlich und räumlich differentielle Expression der *HOX*-Gene ist essentiell für die regelrechte Hämatopoese. Dementsprechend trägt die Dysregulation der *HOX*-Genexpression durch *KMT2A*-Aberrationen zur Entstehung von akuten Leukämien bei.

Innerhalb der *HOX*-Cluster befinden sich Gene für zahlreiche lncRNAs, die während der Differenzierung im gleichen spezifischen Muster exprimiert werden, wie die benachbarten proteinkodierenden Gene. Die Untersuchung einzelner *HOX*-lncRNAs hat gezeigt, dass diese nicht nur die Expression benachbarter oder weiter entfernter *HOX*-Gene regulieren, sondern auch einen unabhängigen Effekt auf andere Signalwege haben können. Somit wirken *HOX*-lncRNAs selbst als wichtige Faktoren in der Differenzierung und Onkogenese. Der genomische Locus der lncRNA *HOXA10-AS* ist im Rahmen der Hämatopoese und Leukämogenese bereits gut untersucht: Sowohl das proteinkodierende Gen *HOXA10* als auch die microRNA miR-196b sind entscheidend an der hämatopoetischen Differenzierung beteiligt und im Rahmen von *KMT2A*-r AML überexprimiert.

Basierend auf diesen Vorkenntnissen ist es Ziel dieser Arbeit, die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

1. Welchen Einfluss hat *HOXA10-AS* auf die physiologische Hämatopoese?
2. Welche Rolle spielt *HOXA10-AS* in der Pathogenese der AML, insbesondere der *KMT2A*-r AML?
3. Über welchen Mechanismus übt die lncRNA *HOXA10-AS* ihre Wirkung aus? Ist ein Effekt auf die benachbarten Onkogene *HOXA10* und mir-196b nachzuweisen?
4. Wie lassen sich die molekularbiologischen Erkenntnisse über *HOXA10-AS* in die klinische Anwendung transferieren?

.

3. Material und Methodik

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Die AML-Zelllinien ML-2, EOL-1, MOLM-13, MV4-11 und NB-4 sowie die Zelllinie HEK293T wurden vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben und in der empfohlenen Zelldichte und den empfohlenen Medien kultiviert (s. **Tabelle 1**). HEK293T Zellen wurden in DMEM (Biochrom) + 10% FCS (Thermo Fisher Scientific, Gibco) + 1% PenStrep + 1% Natriumpyruvat + 1% Glutamin + 1% MEM-NEAA (alle Sigma Aldrich) kultiviert. Bei jeder Passage der adhärenenten HEK293t-Zellen wurde Trypsin (Thermo Fisher Scientific (Gibco)) 1:10-fach verdünnt zum Ablösen der Zellen verwendet. Zellzählungen wurden mittels Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH) nach Anfärbung mit Trypanblau (Biochrom) durchgeführt.

Tabelle 1: Genutzte Zelllinien und ihre Charakteristika

Zelllinie	FAB-Klassifikation	Zytogenetik	Kulturmedium
ML-2	AML M4	t(6;11)(q27;q23)	RPMI 1640 (Lonza) + 10% FCS + 1% PenStrep + 1% Natriumpyruvat
EOL-1	eosinophile AML	KMT2A-PTD	
MOLM-13	AML M5a	ins(11;9)(q23;p22p23)	
MV4-11	AML M5	t(4;11)(q21;q23)	
NB-4	AML M3 (APL)	t(15;17)(q22;q11-12.1)	

3.1.2 Hämatopoetische Zellen

HSPCs aus dem Nabelschnurblut, HSPCs aus dem peripheren Blut und alle anderen mononukleären Zellen wurden von anonymen gesunden Probanden gespendet. Die mononukleären Zellen wurden aus den peripheren Blutproben oder dem Nabelschnurblut mithilfe des Dichtegradienten über eine Ficoll-Lösung (GE HealthcareLife Sciences) selektiert. Die verschiedenen hämatopoetischen Zellpopulationen wurden in Vorarbeiten unserer Gruppe [73] anhand von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch sortiert (s. **Tabelle 2**). HSPCs aus peripherem Blut und aus Nabelschnurblut wurden durch Markieren

von CD34-positiven Zellen mit magnetischen *Beads* (MicroBead Kit, Miltenyi Biotech) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert.

Tabelle 2: Durchflusszytometrische Sortierung der einzelnen hämatopoetischen Zellpopulationen

Zelltyp	Oberflächenmarker
HSCs	Lin ⁻ / CD34 ⁺ / CD38 ⁻
CMPs	Lin ⁻ / CD34 ⁺ / CD38 ⁺ / CD123 ⁺ / CD45RA ^{mittel}
GMPs	Lin ⁻ / CD34 ⁺ / CD38 ⁺ / CD123 ⁺ / CD45RA ^{hoch}
Granulozyten	FS ^{hoch} , SS ^{hoch} , CD15 ⁺ , CD66 ⁺
Monozyten	FS ^{hoch} , SS ^{niedrig/mittel} , CD14 ⁺
NK-Zellen	FS ^{niedrig} , SS ^{niedrig} , CD56 ⁺ , CD3 ⁻
CD4-T-Zellen	FS ^{niedrig} , SS ^{niedrig} , CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8-T-Zellen	FS ^{niedrig} , SS ^{niedrig} , CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺
B-Zellen	FS ^{niedrig} , SS ^{niedrig} , CD19 ⁺ , CD3 ⁻ , CD56 ⁻

3.1.3 AML-Patientenblasten

AML-Patientenproben wurden von der AML-Studiengruppe Berlin-Frankfurt-Münster (AML-BFM-SG, Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Patientenblasten (PDX) wurden durch serielle *in vivo* Transplantationen in transgene Mäuse im Rahmen von Vorarbeiten unserer Gruppe expandiert. Die *in vitro* Kultivierung der PDX erfolgte in StemSpan SFEM (StemCell Technologies) mit 1% PenStrep (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL FLT3, 20 ng/mL TPO, 10 ng/mL IL6, 2,5 ng/mL IL3 (alle Peprotech), StemRegenin 1 (SR1, 750nM; Stemcell Technologies) und UM171 (350nM; Stemcell Technologies). [88] Die Herkunft und genetischen Merkmale der verwendeten Patientenblasten sind in **Tabelle 3** zusammengefasst:

Tabelle 3: Charakteristika der verwendeten AML-Patientenblasten

	PDX#1	PDX#2
Patientenalter bei Diagnose	10 Jahre	8 Jahre
FAB-Klassifikation	AML M5	AML M4
Zytogenetik	t(9;11)(p22;q23)	t(9;11)(p22;q23)

Die informierte Einwilligung wurde von allen Studienteilnehmern oder Betreuern eingeholt. Alle Untersuchungen wurden von der örtlichen Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover und der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den örtlichen Gesetzen und Vorschriften durchgeführt.

3.2 Hämatopoetischer Differenzierungsassay

Die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums zur Expansion der HSPCs vor der Transduktion sowie der monozytären Differenzierungsmedien [89] sind im Folgenden dargestellt:

Tabelle 4: Zusammensetzung der Differenzierungsmedien für HSPCs

Expansionsmedium	StemSpan SFEM ¹ , PenStrep ² 1%, Ciprobay ⁴ 0,10%, SCF ³ 100 ng/ml, FLT3 ³ 100 ng/ml, IL-6 ³ 20 ng/ml, TPO ³ 50 ng/ml SR-1 ¹ 0,75 µM, UM-171 ¹ 0,1 µM
Monozytäres Differenzierungsmedium Woche 1	RPMI 1640 ² , PenStrep ² 1%, Ciprobay ⁴ 0,10%, FCS ² 10,00%, L-Glutamin ² 1,00%, FLT3 ³ 50 ng/ml, GM-CSF ³ 10 ng/ml, M-CSF ³ 50 ng/ml, IL-3 ³ 10 ng/ml, IL-6 ³ 10ng/ml
Monozytäres Differenzierungsmedium Woche 2	RPMI 1640 ² , PenStrep ² 1%, Ciprobay ⁴ 0,10%, FCS ² 10,00%, L-Glutamin ² 1,00%, GM-CSF ³ 10 ng/ml, M-CSF ³ 50 ng/ml, IL-6 ³ 10ng/ml

¹ - StemCell Technologies, ² - Thermo Fisher Scientific (Gibco), ³ – Immunotools, ⁴ - Fresenius Kabi

Für die koloniebildenden-Assays auf Basis von Methylcellulosegel (MethoCult™, Human Methylcellulose Complete Medium HSC003, R & D Systems) wurden initial 10 000 Zellen pro Platte verwendet. Die Zellen wurden für die anfängliche Plattierung in Resuspensionslösung (50% IMDM, 50% FCS (beide Thermo Fisher Scientific, Gibco)) aufgenommen und in jeweils 1ml Methocult-Medium mit Zusatz von Pen/Strep, Ciprobay und Amphotericin B gegeben. Die Auszählung der verschiedenen hämatopoetischen Kolonietypen erfolgte lichtmikroskopisch.

Für die Zytospins wurden 100 000 Zellen in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 300rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung mittels May-

Grünwald-Giemsa-Färbung. Die Ausstriche wurden mit dem elektronischen Lichtmikroskop BZ-9000 (Keyence) untersucht.

3.3 Molekularbiologische Verfahren

3.3.1 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real time-PCR

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Quick RNA Microprep Kit oder dem Quick RNA Miniprep Kit (beide Zymo Research). Die RNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die cDNA-Synthese wurde entweder mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) mit 1000ng bis 2000ng RNA-Input oder für die Messung von microRNA-Expressionsleveln mit dem Taqman microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) mit 10ng RNA-Input durchgeführt. Für qRT-PCRs wurde als fluoreszierendes Reportermolekül der SYBR Select Mastermix (Applied Biosystems) und für die Messung der microRNA-Expression der Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) genutzt. Als *Housekeeping*-Gene kamen Beta-2-Microglobulin (B2M) bzw. RNU48 und U6 für die taqman-PCR zum Einsatz. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit DNase-freiem Wasser anstelle von cDNA verwendet. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Sequenzen der Primer sind in Abschnitt 3.13 aufgeführt. Alle Messungen wurden an einem StepOnePlus Cyler (Applied Biosystems) vorgenommen und mit der StepOne Software v.2.3 ausgewertet. Folgende Parameter wurden für die qRT-PCR verwendet (s. **Tabelle 5**):

Tabelle 5: Verwendete Temperatur- und Zeitparameter bei der qRT-PCR

	qRT-PCR-Parameter
Denaturierung	95°C für 15 Sek.
Primerhybridisierung	58,5°C für 15 Sek.
Elongation	72°C für 30 Sek.

Im Anschluss an den PCR-Prozess folgte eine Schmelzkurve von 56-95°C zur Detektion unspezifischer Doppelstrang-DNA oder Primer-Dimere.

Für die Messung der Expression des Zielgens wurde die Differenz der *threshold cycle*-Werte (ΔCt) des Housekeeping-Gens und des Zielgens bestimmt. ΔCt wurde folgendermaßen

berechnet: $2^{-(Ct(\text{Probe})-Ct(\text{Housekeeper}))}$. Für die Ermittlung der Änderung der Genexpression im

Rahmen der Überexpressions- bzw. *Knockdown*-Experimente wurde die geNORM $\Delta\Delta Ct$ Berechnung genutzt [90]: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\text{Kontrolle})$.

3.3.2 Zelluläre Fraktionierung

Die Fraktionierung der zellulären Kompartimente in zytosolisch, nuklear-löslich und nukleär-chromatin-assoziiert erfolgte wie bereits beschrieben [91]. Zur Auftrennung der Bestandteile in zytosolisch und nukleär-gesamt wurde Lösung RLN1 verwendet, zur Auftrennung der nukleären Bestandteile Lösung RLN2 (s. **Tabelle 6**). Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qRT-PCR (s. Abschnitt 3.3.1).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen, die zur zellulären Fraktionierung genutzt wurden

RLN1	RLN2
H ₂ O (Thermo Fisher Scientific)	H ₂ O (Thermo Fisher Scientific)
50 mM TrisHCl pH 8,0 (Bio-Rad)	50 mM TrisHCl pH 8,0 (Bio-Rad)
140mM NaCl (Sigma-Aldrich)	500mM NaCl (Sigma-Aldrich)
1,5mM MgCl ₂ (Sigma-Aldrich)	1,5mM MgCl ₂ (Sigma-Aldrich)
0,5% NP40 (Invitrogen)	0,5% NP40 (Invitrogen)
2mM VRC (Sigma-Aldrich)	2mM VRC (Sigma-Aldrich)

3.4 Klonierung

3.4.1 Klonierung LBid-HOXA10-AS:GFP

Für die Klonierung des Überexpressionsvektors LBid-HOXA10-AS:GFP wurde die *HOXA10-AS*-Sequenz als Insert in den in unserer Arbeitsgruppe entwickelten LncRNA-Vektor LBid-lnc-GFP [92] eingefügt (s. **Abbildung 4**). Dazu wurde die Gensequenz für *HOXA10-AS* (Isoform 202) aus einem pMA-Vektor (Life Technologies) mit den Restriktionsenzymen AgeI und XhoI (beide Thermo Fisher Scientific) herausgeschnitten und das Vektor-*Backbone* LBid-lnc:GFP mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Der Restriktionsansatz für das Insertfragment enthielt jeweils 2 μ l der beiden Restriktionsenzyme, 4 μ l Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), 10 μ g des Vektors pMA-HOXA10-AS und H₂O. Der Verdau erfolgte für 120 Minuten bei 37°C. Zur Selektion des Fragments wurde das Inkubationsprodukt in ein 1,5%-iges Agarosegel (TE-Puffer

(AppliChem), Agarose (Invitrogen) und Midori Green (Nippon Genetics)) gegeben. Dazu wurde der Probe 6xTriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific) hinzugefügt. Eine DNA-Leiter (GeneRuler 100 oder 1000bp DNA Ladder (Thermo Scientific)) diente als Größenvergleich. Es erfolgte eine Fotoaufnahme des Gels mittels ChemiDoc XRS (Bio-Rad) und anschließend das Ausschneiden der erwarteten Bande auf einem UV Transilluminator (peqlab). Die Aufreinigung wurde mittels GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) durchgeführt.

Der Restriktionsansatz für den Vektor LBid-Inc:GFP setzte sich aus 2000ng des Vektors, jeweils 2µl der Enzyme AgeI und XhoI, 5µl Tango Puffer und H₂O (Thermo Fisher Scientific) zusammen. Die Inkubation erfolgte für 120 Minuten bei 37°C. Zur Dephosphorylierung wurde anschließend 1µl FastAP Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 15 Minuten inkubiert. Der linearisierte Vektor wurde in ein Agarosegel gegeben und daraufhin mittels GeneJET Gel Extraction Kit aufgereinigt. Für die Ligation wurden der Vektor und das Fragment in einem Volumenverhältnis von 1:3 gemischt und zusammen mit den Komponenten des Rapid DNA Ligation Kit (Roche) für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Ansatz mit DNase-freiem Wasser anstelle des Inserts diente als Negativkontrolle.

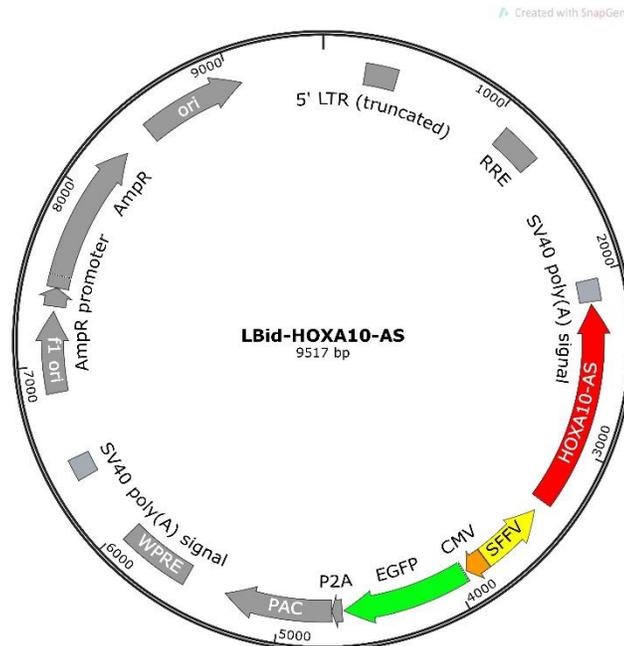


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Überexpressionsvektors LBid-HOXA10-AS:GFP

Es wurden 2-5µl des Ligationsergebnisses mit 50µl XL-1 Blue E. coli-Bakterien zusammengegeben. Zunächst wurde die Reaktion für 5 Minuten auf Eis gestellt, dann erfolgte für 40 Sekunden die Transformation im Hitzeschock bei 42°C und schließlich die erneute Ruhephase auf Eis für 5 Minuten. Nach Hinzufügen von 200µl SOC-Medium (SOB-Medium (Carl Roth) mit MgCl₂ (Carl Roth), MgSO₄ (Carl Roth) und Glucose (Merck)) wurde der Ansatz bei 37°C für mindestens 30 Minuten in einem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten (1% Trypton, 1% NaCl, 0,3% Hefeextrakt, 1,5% Agar mit Ampicillin (alle Applichem)) zur Selektion der Kolonien gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Kolonien von den LB-Platten jeweils einzeln in LB-Medium (H₂O (Thermo Fisher Scientific) mit 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1% Natriumchlorid (alle Applichem)) mit Ampicillin transferiert und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) gemäß Herstellerangaben. Zur Kontrolle des Ligationserfolgs wurde ein Kontrollverdau mit AgeI und XhoI (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Zur Sequenzierung wurden 1200ng des klonierten Vektors, 3µl des Sequenzierprimers (s. Abschnitt 3.13) und H₂O zusammengegeben und von Microsynth Seqlab in Göttingen verarbeitet. Es erfolgte ein Abgleich der klonierten Sequenz mit der Zielsequenz mit Hilfe des ClustalW-Blast. Anschließend wurde das Plasmid mittels Plasmid Maxi Kit (Quiagen) präpariert.

3.4.2 Klonierung pLKO5d.SFFV.eGFP.miR30n-shHOXA10-AS

Die shRNAs (Sequenzen s. Abschnitt 3.13) wurden als DNA-Oligonukleotide (Integrated DNA Technologies) produziert. Die Phosphorylierung von Sense- und Antisense-Oligonukleotiden erfolgte mittels T4 Polynukleotidkinase und T4 DNA Ligase Puffer (beide Thermo Fisher Scientific). Die Annealing-PCR der Oligonukleotide lief folgendermaßen ab: 37°C für 45 Minuten, 95°C für 2,5 Minuten, schrittweises Herunterkühlen mit 0,1°C/Sekunde bis auf 22°C. Der Restriktionsansatz des Vektors pLKO5d.SFFV.eGFP.miR30n (Addgene #90333) [73] enthielt das Restriktionsenzym BsmBI, sowie den Puffer 3.1 (beide NEB) und H₂O. Nach der Dephosphorylierung mit FastAP und der Gelaufreinigung des linearisierten Vektors mittels GeneJET Gel Extraction Kit erfolgte die Ligation des Oligonukleotid-Duplex mit 30-50µg des Vektors durch T4 DNA Ligase und T4 DNA Ligase Puffer (beide Thermo Fisher Scientific).

Für den shRNA-Reporterassay wurde ein gBlock (Integrated DNA Technologies) mit den shRNA-Bindungsstellen entworfen und mithilfe der Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI (Thermo Fisher Scientific) in einen pTtNPT-Vektor kloniert [93]. HEL-Zellen (DSMZ) wurden zur Durchführung des Reporterassays mit dem gBlock-Vektor und den shRNA-Vektoren transduziert. Die shRNA-Effizienz wurde mittels des durchflusszytometrisch ermittelten Anteils der Fluoreszenz-positiven Zellen im Vergleich zu einer nicht-bindenden shRNA 6 Tage post-Transduktion berechnet.

3.4.3 Klonierung SGL40C.CRISPR.EFS.GFP-dual-sgHOXA10-AS

AML-Zelllinien wurden mit dem Vektor pLKO5d.SFFV.Cas9.P2A.BSD transduziert, um stabile Cas9-exprimierende Zelllinien zu generieren. Zur Selektion der mit Cas9-transduzierten Zellen wurde Blasticidin (Applichem) eingesetzt.

Die sgRNAs wurden mithilfe des CCTop-Online-Tools entworfen und als DNA-Oligonukleotide (Integrated DNA Technologies) hergestellt. Die Klonierung der sgRNA-Paare in den dual-sgRNA-Vektor SGL40C.CRISPR.EFS.GFP [94,95] erfolgte analog zur Klonierung des shRNA-Vektors (s. Abschnitt 3.4.2).

Für die Untersuchung der Effizienz der sgRNAs im Rahmen eines Reporterassays wurden die sgRNA-Bindungsstellen in unseren SIN40C.SFFV.sfGFP-Rep.iPAC-Vektor eingefügt. [94] HEL-Zellen wurden daraufhin mit dem Reportervektor und den sgRNA transduziert. Die sgRNA-Effizienz wurde anhand der Reduktion des Anteils der Fluoreszenz-positiven Zellen im Vergleich zu einer nicht-bindenden sgRNA 6 Tage post-Transduktion durchflusszytometrisch untersucht.

3.5 Herstellung lentiviraler Partikel

Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurden HEK293t-Zellen mit den Vektoren mittels Polyethylenimin-Lösung (PEI) (Polysciences) im Verhältnis 3:1 (PEI:DNA) transfiziert. Als Verpackungsplasmide wurden psPAX2 (Addgene, Plasmid #12260) und pMD2.G (Addgene, Plasmid #12259) genutzt. Der Transduktionsansatz für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 Zentimetern setzte sich wie folgt zusammen: 18µg DNA insgesamt (6µg Vektor, 10µg psPAX2, 2µg MD2.g), 200µl OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 200µl PEI-Lösung. 6-8 Stunden post-Transfektion erfolgte im Rahmen eines Mediumwechsels das Hinzufügen von 2mM Koffein zum DMEM. Für die Aufkonzentration wurden die lentiviralen Partikel im Mediumüberstand zweimalig (32 und 56 Stunden post-Transfektion) gesammelt, durch 0,45µm-Filter (Sarstedt) filtiert und

anschließend bei 12000rpm und 4°C über Nacht ultrazentrifugiert (Beckman L-70 Ultra Centrifuge). Die Resuspension des Virus erfolgte in IMDM (Thermo Fisher Scientific, Gibco). Im Anschluss wurden die Viruspartikel mit dem Lenti-X-Concentrator-Kit (TaKaRa) in einem Verhältnis von 3:1 (Virus: Concentrator) gemäß den Angaben des Herstellers weiter aufkonzentriert. Der Virus wurde in StemSpan SFEM (StemCell Technologies) resuspendiert und bei -80°C gelagert. Für die Virustitration wurden HEL-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des 1:10 mit PBS verdünnten Virus in Anwesenheit von 1mg/ml Polybrene (Sigma Aldrich) transduziert. Die nach 72h gemessene Fluoreszenz diente der Berechnung der Viruskonzentration.

3.6 Transduktion

Für die Transduktion der HSPCs, ML-2 Zellen und PDX mit dem Überexpressionsvektor L_{Bid}-HOXA10-AS:GFP wurden aufkonzentrierte Viruspartikel verwendet. Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurde 2µg/ml Hexadimethrinbromid (Polybrene (Sigma Aldrich)) hinzugefügt. HSPCs wurden auf mit Retronectin (TaKaRa) benetzten Zellkulturplatten mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 50 transduziert. Die Selektion der transduzierten HSPCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Zur Transduktion der Zelllinien mit den shRNA- und sgRNA-Vektoren wurde der Virusüberstand der transfizierten HEK293t-Zellen genutzt.

3.7 LNA-GapmeRs

LNA-GapmeRs gegen *HOXA10-AS* wurden von Exiqon entworfen und bereitgestellt (s. Abschnitt 3.13). Negativkontrolle B (Exiqon) wurde als nicht-bindende Kontrolle verwendet. Die Proliferation der Zelllinien wurden nach Hinzugabe von 2,5µM LNA-GapmeRs an Tag 0 und Tag 5 zum Kulturmedium (unassistierte Aufnahme) durch durchflusszytometrische Zellzählung analysiert.

3.8 NF-κB-Signaltransduktionsassays

Für die NF-κB-Signaltransduktionsassays wurden 1×10^6 transduzierte GFP⁺ ML-2-Zellen in 2% Paraformaldehyd fixiert und unter Verwendung von eiskaltem Methanol permeabilisiert. Phosphoryliertes p65 (pSer529) wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines PE-Maus-Anti-NF-κB-p65-(pS529)-Antikörpers (Klon K10-895.12.50; BD Biosciences) nachgewiesen. Für die NF-κB-Inhibitionsexperimente in ML-2 Zellen und

HSPCs wurden die Zellen 72 Stunden vor der FACS-Messung mit 1 μ M BMS-345541 (Sigma Aldrich) behandelt. Als Kontrolle wurden den Zellen DMSO (Sigma Aldrich) hinzugefügt. Im Rahmen des ML-2-Zell-Proliferationsassays wurde BMS-345541 in Konzentrationen von 0,5 μ M, 1 μ M und 2,5 μ M bei jedem Mediumwechsel alle 2-3 Tage hinzugefügt.

3.9 Mausexperimente

Primäre humane AML-Zellen (PDX) wurden mittels OKT3 (BioXCell) CD3-depletiert und nach serieller Transplantation für den *in vivo* shRNA-*Knockdown*-Versuch im Xenotransplantat-Mausmodell verwendet [88]. Dazu wurden AML-Zellen 2 Tage post-Transduktion in mit 2,5Gy bestrahlte immundefiziente NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ-Empfängertiere (NSG Mäuse, Charles River) intravenös transplantiert. Zum Endpunkt des Experiments wurden die Versuchstiere mittels CO₂ narkotisiert und mit einer zervikalen Dislokation euthanasiert. Es erfolgte die Präparation der Femur- und Tibiaknochen beidseits sowie der Leber und der Milz. Nach Filterung der Zellen durch ein Zellsieb (BD Biosciences) folgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte. Zur Lyse der Erythrozyten wurde RBC-Lysis-Puffer (PBS (Sigma Aldrich) mit NH₄Cl (Sigma Aldrich), KHCO₃ (Sigma Aldrich) und EDTA (Applichem)) verwendet. Die isolierten Zellen wurden per FACS-Analyse untersucht. Alle Tierversuche wurden von den zuständigen Behörden genehmigt.

3.10 Microarray-Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalysen wurden in der Core-Facility des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig unter Verwendung des Gene-Expression Affymetrix Microarray Clariom™ S Pico Assay als Array-Plattform durchgeführt. Die Daten wurden mittels R verarbeitet und analysiert. Die Überprüfung der Array-Qualität erfolgte mittels Sondenintensitätsverteilung und Hauptkomponentenanalyse von log₂-transformierten Rohdaten. Die Daten wurden log₂-transformiert, quantilnormalisiert und mit dem LIMMA-Paket auf differentielle Expression getestet. Die Arrays wurden mithilfe der Clariom™ S Array-Clusterannotationen für humane Transkripte, Version 36 (Affymetrix NetAffx-Webportal) annotiert. Mit Hilfe der BROAD GSEA-Software wurde eine Gene Set Enrichment Analyse der differentiell exprimierten Gene durchgeführt. Die Gen-Sets für die GSEA wurden der Datenbank MSigDB.v6.2™ entnommen (C2, C3, C5, C6, hallmark gene sets). Für die Genontologie (GO) -Analyse signifikant hochregulierter Gene wurde g: Profiler verwendet.

3.11 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen der transduzierten HSPCs, Zelllinien und Patientenexplosionen wurden mit einem FACS Canto Durchflusszytometer (BD Biosciences) oder einem CytoFLEX B5-R3-V5 (Beckman Coulter) durchgeführt. Die Sortierung erfolgte an einem FACS Aria II (SORP) oder FACS Aria Fusion (BD Biosciences) in der Core Facility der Medizinischen Hochschule Hannover. Für die Datenanalyse wurde die Software Kaluza 1.3/ 1.5 (Beckman Coulter) verwendet. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen in FACS-Puffer (PBS + 2% FCS + 2mM EDTA) resuspendiert. Für die Färbung der hämatopoetischen Oberflächenmarker kamen folgende Antikörper zum Einsatz: CD163-PE (BD Biosciences), CD11b-PeCy7 (Beckman Coulter), CD14-APC (Beckman Coulter), CD45-V500 (BD Biosciences), CD163-APC-Cy7 (Biolegend), CD45-APC (BD Biosciences), CD15-BV605 (BD Biosciences) und CD66b-PE (BD Biosciences).

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism Version 6 und 7 (STATCON). Je nach experimentellem Design wurde dazu die zweifaktorieller Varianzanalyse (2-Way-ANOVA) oder der ungepaarte t-Test verwendet. Aus Replikaten wurden die Mittelwerte berechnet und in den Grafiken \pm Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) gezeigt. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Für alle Abbildungen gilt: ns = nicht-signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$.

3.13 Weitere Materialien

3.13.1 Übersicht der qRT-PCR Primer

HOXA10-AS fwd	AGGAGAGAACCCTGCCATCG
HOXA10-AS rev	TGGCAAACGGGCTTGACTTT
HOXA10 fwd	TTCCGAGAGCAGCAAAGC
HOXA10 rev	CAGTTGGCTGCGTTTTTAC
HOXA9 fwd	AAAAACAACCCAGCGAAGGC
HOXA9 rev	AGTTGGCTGCTGGGTTATTG
B2M fwd	TGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGA
B2M rev	CACACGGCAGGCATACTCATCTTT
miR-196b taqman Primer	Applied Biosystems ID-Nr #002215
U6 taqman Primer	Applied Biosystems ID-Nr #001973

3.13.2 Übersicht der Sequenzierungsprimer

LBid-Inc-Vektor Seq fwd	GAGCTCACAACCCCTCACTC
LBid-Inc-Vektor Seq Mitte	GGGGGAAAAAGCCATATCAT
LBid-Inc-Vektor Seq rev	AGGCCCGAAGGAATAGAAGA
shRNA-Vektor Seq fwd	GTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTT
sgRNA-Vektor Seq fwd	AGTACAAAATACGTGACGTAG

3.13.3 Übersicht der Zielsequenzen der *loss of function*-Versuche

shRNA-HOXA10-AS#1	AGGACAATATCTATCTCT
shRNA-HOXA10-AS#2	AGGACAATATCTATCTCTAT
shRNA-HOXA10-AS#3	GAGACGATTTCAACTGAAGTA
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#1 fwd	TCCGGTCGTGATCATAACCGAGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#1 rev	CACGCCCCCGGCGTCCGCGAAGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#2 fwd	TCCGGTCGTGATCATAACCGAGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#2 rev	CCGCGAAGGAGCAGCCAACCTAA
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#3 fwd	GGCCTCCCTGCCCTCGATATGGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#3 rev	CACGCCCCCGGCGTCCGCGAAGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#4 fwd	GGCCTCCCTGCCCTCGATATGGG
sgRNA-HOXA10-AS-Pair#4 rev	CCGCGAAGGAGCAGCCAACCTAA
LNA-GapmeR#1	CAAAGTCAAGCCCGTT
LNA-GapmeR#2	GCACCATTGACCTCAG

3.13.4 Weitere Labormaterialien

Accu-jet pro Pipettierhelfer	Brand Tech Scientific
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-one
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Spritzenfilter Filterpur S 0,2µm ,0,45µm	Sarstedt
Gefrier Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Nunc
MicroAmp optische 96-Well- qPCR Platten	Applied Biosystems
MicroAmp optische qCR 8-Röhrchen- Streifen	Applied Biosystems
MicroAmp qPCR Folien	Applied Biosystems

PCR-Gefäße 8-Röhrchen-Streifen	Thermo Fisher Scientific
PCR-Gefäße Deckel	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen mit Filter, steril, (2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt
SafeSeal Reaktionsgefäße steril 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Sarstedt
Zellkulturplatten und Zellkulturflaschen, Suspension/adhärent	Sarstedt
Nunclon Petrischale 10x35 mm	Thermo Fisher Scientific, Nunc
Zellsieb 40 µm	BD Biosciences

3.13.5 Geräte

Axiovert 40CFL Mikroskop	Carl Zeiss
BBD 6220 CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Beckman L-70 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Binder Inkubator	Binder
BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence
ChemiDoc XRS	Bio-Rad
CO2 incubator C200	Labotect
CytoFLEX B5-R3-V5	Beckman Coulter
Cytospin 2 Zentrifuge	Shandon
Eppendorf 5424 Zentrifuge	Eppendorf
Eppendorf 5418 Zentrifuge	Eppendorf
FACS Canto	BD Biosciences
Gel Doc XR+	Bio-Rad
GFL Wasserbad	Omnilab
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Megafuge 16 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Multifuge X3 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Labcyler 96	Sensoquest
Lab Dancer Vortexer	IKA

Liebherr Premium NoFrost, 4°C und -20°C	Liebherr
Mini-SUB® Cell GT Gelkammer	Bio-Rad
MS 3 basic Vortexer	IKA
Multitron Standard Inkubator	Infors-HAT
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Olympus CKX 41 Mikroskop	Olympus
PeqStar 96 Universal Gradient Cycler	Peqlab
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad
RM5 Shaker	Karl Hecht
Sharp Inverter Mikrowelle	Sharp
Sanyo MDF-U73V Gefrierschrank	Sanyo
Sartorius CPA64 Waage	Sartorius
Sorvall RC6+ Superspeed Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Sprout® Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific
StepOnePlus Real-Time PCR system	Applied Biosystems
TFX-20-ML UV-Gerät	Peqlab
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries

4. Ergebnisse

4.1 *HOXA10-AS* in der Hämatopoese

4.1.1 Expressionsprofil der Gene des *HOXA10-AS* Locus während der Hämatopoese

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße die lncRNA *HOXA10-AS* während der unterschiedlichen Stadien der physiologische Hämatopoese exprimiert wird. Im Rahmen von Vorarbeiten unserer Gruppe wurden unterschiedliche hämatopoetische Zellpopulationen aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels durchflusszytometrischer Sortierung anhand von Zelltyp-spezifischen Oberflächenmerkmalen gewonnen. Folgende Zellpopulationen wurden verwendet: Hämatopoetische Stammzellen (HSC), gemeinsame myeloische Progenitoren (CMP), Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren (MEP), Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP), erythroide Zellen (Ery), Natürlichen Killerzellen (NKC), Monozyten (Mono), CD8-T-Lymphozyten (CD8-TC), CD4-T-Lymphozyten (CD4-TC), Megakaryozyten (Mk) und Granulozyten (GC). Die Expression von *HOXA10-AS* und der benachbarten Gene *HOXA10* und mir-196b wurde mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bzw. TaqMan[®]-PCR in den unterschiedlichen hämatopoetischen Zellpopulationen bestimmt. Die Genexpression wurde in Relation zu dem *Housekeeping*-Gen (HK) Beta-2-Mikroglobulin (für *HOXA10-AS* und *HOXA10*) bzw. zu den *Housekeeping*-Genen RNU48 und U6 (für mir-196b) ermittelt. Dabei zeigte sich, dass *HOXA10-AS* ausschließlich in HSCs hoch exprimiert wird und im Verlauf der weiteren Hämatopoese stark herunterreguliert wird, sodass in differenzierten hämatologischen Zellen, wie Erythrozyten, Lymphozyten und Granulozyten nahezu keine Expression dieser lncRNA mehr nachweisbar ist (s. **Abbildung 5**).

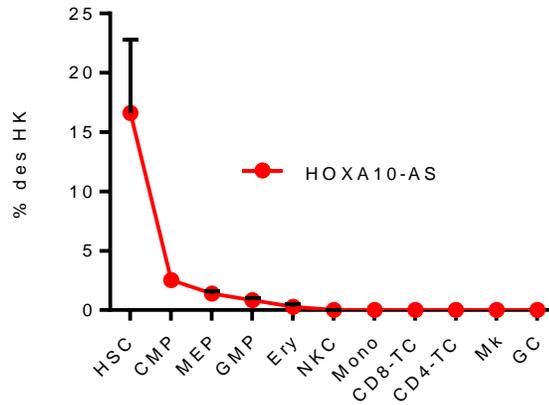


Abbildung 5: *HOXA10-AS* Expressionsprofil in der Hämatopoese
(Mittelwerte + SEM (n ≥ 3))

Die benachbarten Gene *HOXA10* und *mir-196b* werden, wie bereits beschrieben [35,83], ebenfalls hoch in HSCs exprimiert, im Gegensatz zu *HOXA10-AS* bleibt ihre Expression jedoch auch in den hämatopoetischen Vorläuferzellpopulationen, wie den CMPs und GMPs noch relativ hoch und sinkt erst im Laufe der weiteren Differenzierung stark ab (s. **Abbildung 6**).

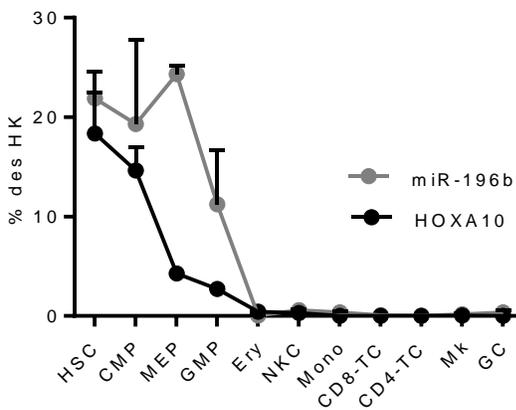


Abbildung 6: *HOXA10* & *miR-196b* Expressionsprofil in der Hämatopoese
(Mittelwerte + SEM (n ≥ 3))

4.1.2 Einfluss der *HOXA10-AS* Überexpression auf die monozytäre Differenzierung

Das spezifische Expressionsmuster von *HOXA10-AS* deutet auf eine wichtige regulatorische Funktion der lncRNA in der Hämatopoese hin. Um den Einfluss von *HOXA10-AS* auf die myeloide Differenzierung zu untersuchen, wurden CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut gesunder Probanden (HSPCs) lentiviral mit *HOXA10-AS* transduziert und daraufhin in monozytärem Differenzierungsmedium kultiviert.

Für die virale Überexpression von lncRNAs wurde in unserer Arbeitsgruppe ein lentiviraler Vektor (LBid-lnc) mit bidirektionalem Promotorsystem generiert, der eine Expression der jeweiligen lncRNA ohne angrenzende virale Sequenzelemente ermöglicht [92]. Dabei befindet sich der SFFV-Promotor in antisense-Richtung vor der lncRNA-Kassette, gefolgt von einer *downstream* poly- A-Sequenz, welche die Transkription der lncRNA terminiert. Dabei bleiben die Sequenz und Sekundärstruktur der lncRNA erhalten, ohne dass virale Sequenzen mit transkribiert werden. Der sense-CMV-Promotor steht vor der Sequenz für ein Fluoreszenzprotein - in diesem Fall eGFP oder dTomato - das als Selektionsmarker für die transduzierten Zellen dient. Dieses bidirektionale Promotorsystem ermöglicht somit eine zuverlässige Kontrolle der Transduktionseffizienz mittels Detektion der Fluoreszenz und gleichzeitig eine konstante Überexpression der lncRNA (s. **Abbildung 7**).



Abbildung 7: Schematische Darstellung des lentiviralen LBid-lnc Überexpressionsvektors

Im Anschluss an die Klonierung von *HOXA10-AS* in den LBid-lnc Vektor, die lentivirale Transduktion von HSPCs und die durchflusszytometrische Sortierung der fluoreszierenden Zellen wurden die Effekte der *HOXA10-AS* Überexpression auf die monozytäre Differenzierung anhand von Proliferationsanalysen, Durchflusszytometrie, Lichtmikroskopie und Koloniebildungsassays genauer charakterisiert (s. **Abbildung 8**).

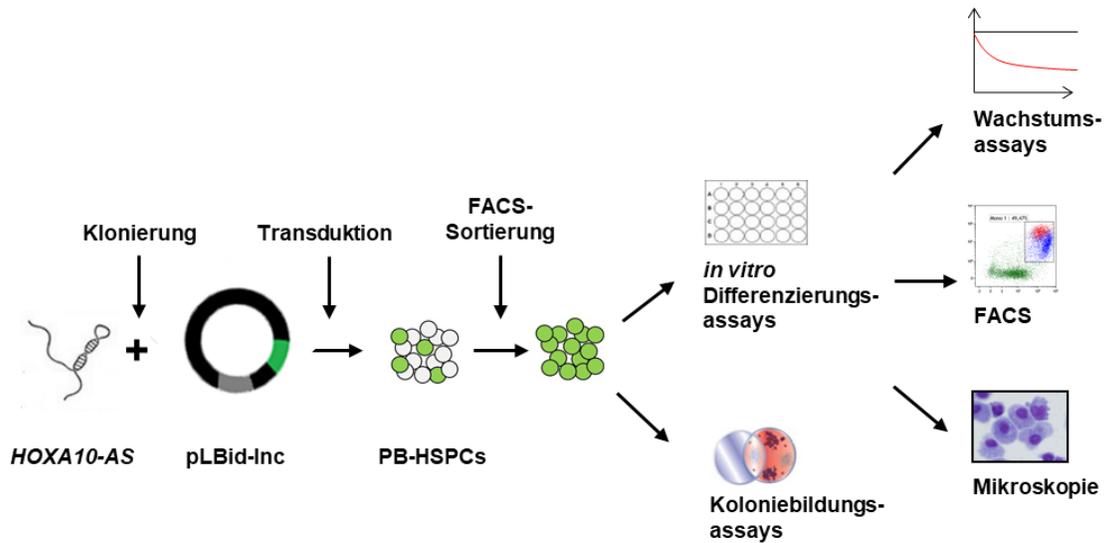


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die *HOXA10-AS* Expressionslevel, die im Rahmen der lentiviralen Überexpression erzielt werden konnten, wurden mittels qRT-PCR quantifiziert (s. **Abbildung 9**). Als Kontrolle dienten dabei HSPCs, die mit dem leeren LBid-Inc Vektor transduziert wurden.

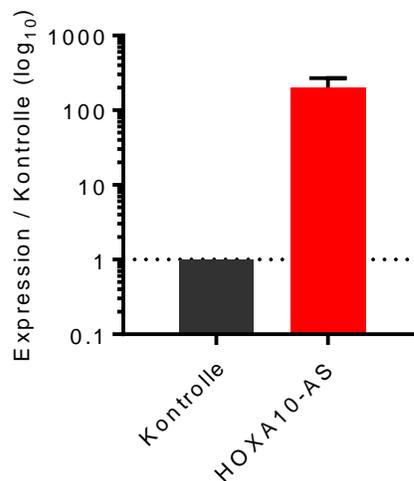


Abbildung 9: *HOXA10-AS* Expression in transduzierten HSPCs an Tag 5 der Differenzierung (Mittelwerte + SD (n=6))

Im *in vitro* Differenzierungsassay wurde die monozytäre Differenzierungskapazität der Zellen an Tag 11 mittels durchflusszytometrischer Detektion der Oberflächenantigene CD11b, CD14 und CD163 analysiert. Dabei ergab sich jeweils eine signifikante Reduktion der monozytären CD11b⁺/CD14⁺ (1,7-fache Reduktion, $p < 0,0001$) und CD14⁺/CD163⁺ (2,1-fache Reduktion, $p < 0,0001$) Zellpopulationen (s. **Abbildung 10**).

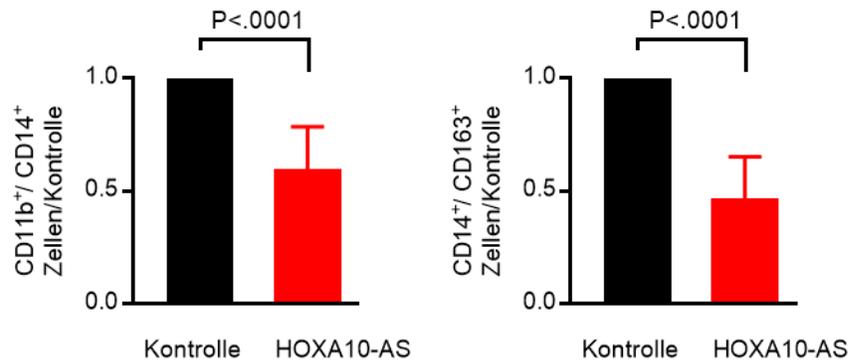


Abbildung 10: FACS-Analyse der monozytären Differenzierung (Mittelwerte \pm SD (n=3), ungepaarter t-Test)

Dieser partielle Differenzierungsblock konnte auch auf zytomorphologischer Ebene verifiziert werden: In der lichtmikroskopischen Untersuchung der mit May-Grünwald-Giemsa-Färbung behandelten transduzierten Zellen an Tag 10 der monozytären Differenzierung zeigte sich, dass die *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den unauffälligen Monozyten der Kontrollgruppe deutlich kleiner waren, stärker kondensierte Nuklei und weniger Zytoplasma aufwiesen und damit morphologisch am ehesten unreifen monozytären Vorläuferzellen ähnelten (s. **Abbildung 11**).

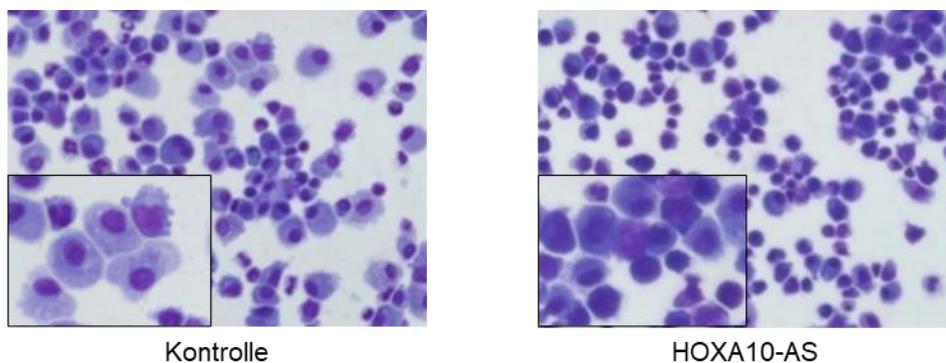


Abbildung 11: Morphologie der transduzierten Zellen an Tag 10 der monozytären Differenzierung (400-fache Vergrößerung)

Die generelle hämatopoetische Differenzierungskapazität der *HOXA10-AS* überexprimierenden HSPCs wurde mittels Koloniebildungsassays untersucht. Dazu wurden 10 000 transduzierte Zellen unmittelbar nach der FACS-Sortierung in ein Medium auf Methylzellulosebasis transferiert und über eine Dauer von 14 Tagen kultiviert. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Anzahl der granulozytären und monozytären Kolonien (CFU-G/M), wohingegen die Anzahl der erythrozytären Kolonietypen (CFU-E, BFU-E) unverändert blieb (s. **Abbildung 12**).

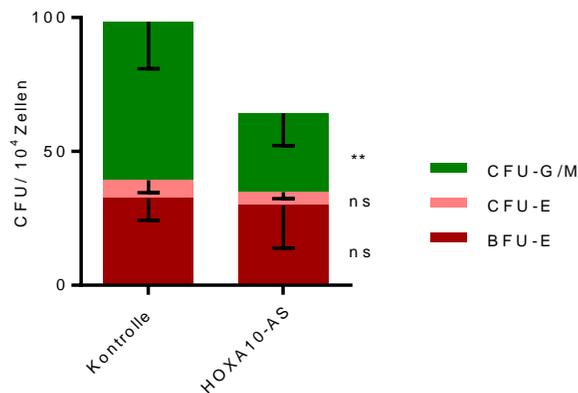


Abbildung 12: Koloniebildungsassay der transduzierten HSPCs

(Mittelwert – SD (n=4); zweifaktorielle Varianzanalyse, **p<0.01, ns= nicht signifikant)

4.2 *HOXA10-AS* in der Leukämogenese

4.2.1 Expressionsprofil der Gene des *HOXA10-AS* Locus in zytogenetischen AML-Subtypen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung der Rolle der lncRNA *HOXA10-AS* in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Akuten Myeloischen Leukämie. Dazu wurden zunächst die Expressionslevel von *HOXA10-AS* und den benachbarten Onkogenen *HOXA10* und *mir-196b* in unterschiedlichen AML-Zelllinien verschiedener zytogenetischer Subgruppen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Genexpression wurde in Relation zu dem *Housekeeping*-Gen (HK) Beta-2-Mikroglobulin (für *HOXA10-AS* und *HOXA10*) bzw. zu den *Housekeeping*-Genen RNU48 und U6 (für *mir-196b*) bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der *HOXA10-AS* Expression zwischen verschiedenen zytogenetischen AML-Subgruppen: In Zelllinien mit *KMT2A-r* Aberrationen (Translokation t(4;11): MV4-11; Translokation t(9;11): NOMO-1, THP-1; Translokation t(6;11): SHI-1, ML-2; Insertion ins(11;9): MOLM-13; partielle Tandemduplikation: EOL-1)

wurde *HOXA10-AS* höher exprimiert als in AML-Zelllinien anderer zytogenetischer Subgruppen (s. **Abbildung 13**).

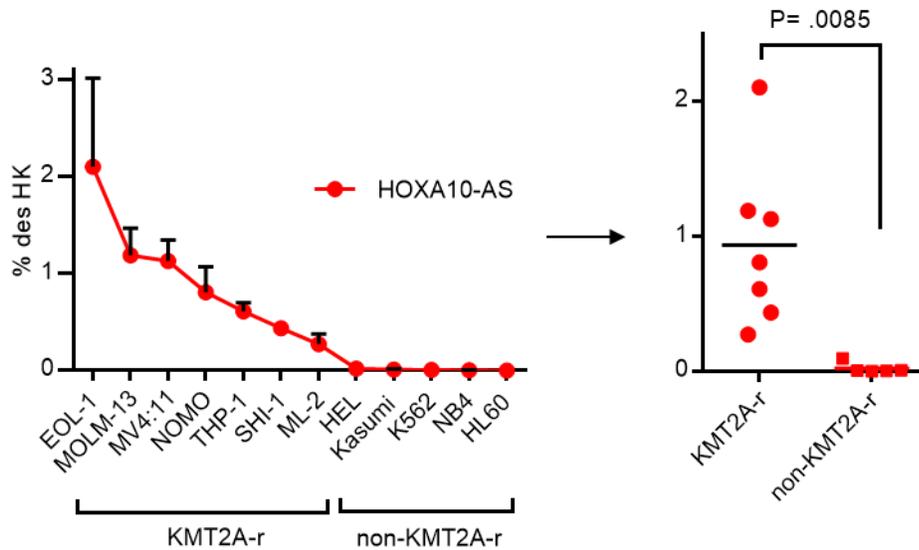


Abbildung 13: Expressionsprofil von *HOXA10-AS* in AML-Zelllinien
(links: Mittelwerte + SEM ($n \geq 2$), rechts: Gegenüberstellung mittels t-Test)

Im Gegensatz zu *HOXA10-AS* zeigte die Expression der benachbarten Gene *HOXA10* und *miR-196b* keinen solchen Unterschied zwischen den entsprechenden *KMT2A-r* und *non-KMT2A-r* Zelllinien (s. **Abbildung 14**).

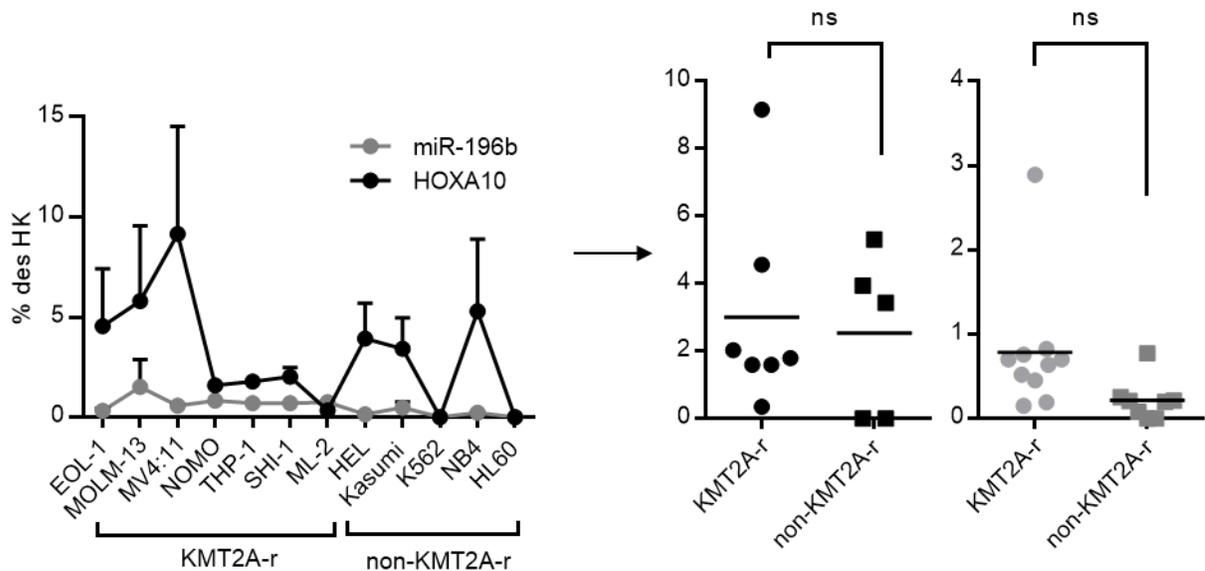


Abbildung 14: Expressionsprofil von *HOXA10* und *miR-196b* in AML-Zelllinien
(links: Mittelwerte + SEM ($n \geq 2$), rechts: Gegenüberstellungen mittels t-Test)

In Vorarbeiten unserer Gruppe wurde ein lncRNA-Atlas für die Hämatopoese und Leukämien erstellt [73]. Für die vorliegende Arbeit wurde in den Microarray-Datensätzen des lncRNA-Atlas die Expression von *HOXA10-AS* in primären Blasten pädiatrischer AML-Patienten untersucht. Im Vergleich zu anderen zytogenetischen Subgruppen wurde *HOXA10-AS* in den *KMT2A*-translozierten Patientenblasten (t(9;11) und t(10;11)) am höchsten exprimiert. Ein signifikanter Unterschied in der *HOXA10-AS* Expression bestand jeweils zwischen den Patientenkohorten mit t(15;17) und t(9;11) (2,5-fach erhöhte Expression, $p=0,0101$) sowie t(8;21) und t(9;11) (1,9-fach erhöhte Expression, $p=0,0109$) (s. **Abbildung 15**).

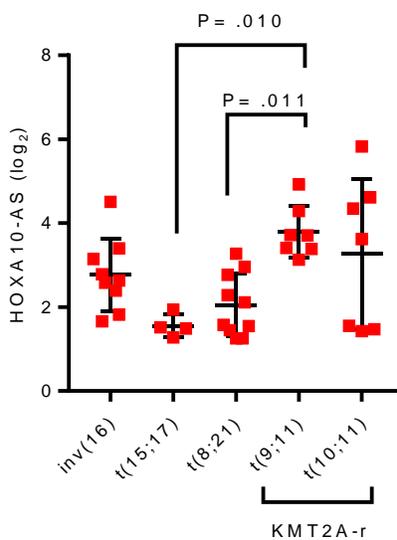


Abbildung 15: Microarray-Expressionsprofil in pädiatrischen AML-Patientenkohorten (einfaktorielle Varianzanalyse)

4.2.2 Einfluss der *HOXA10-AS* Überexpression auf die Leukämogenese

Im nächsten Schritt erfolgte mit Hilfe von *gain-* und *loss of function* Experimenten eine funktionelle Charakterisierung der Rolle von *HOXA10-AS* in der Leukämogenese.

Für die *gain-of-function* Untersuchung wurden zwei verschiedene AML-Zelllinien lentiviral transduziert und mittels *in vitro* Proliferationsassays analysiert. Für die lentivirale *HOXA10-AS* Überexpression wurden die gleichen Vektoren (LBid-*HOXA10-AS*:GFP bzw. LBid-*Inc*:GFP als Kontrolle) genutzt wie für die Überexpression in HSPCs (s. Kapitel 4.1.2). Da die vorherigen Expressionsprofile auf eine hohe Relevanz von *HOXA10-AS* in *KMT2A-r* AML-Zellen hindeuten, wurden für die Überexpression ML-2 Zellen sowie laboreigene *KMT2A-r*-Patientenblasten (im Folgenden PDX#1 genannt) verwendet.

ML-2 wurde als etablierte Zelllinie mit *KMT2A*-Translokation aufgrund der vergleichsweise geringen endogenen *HOXA10-AS* Expression (vgl. **Abbildung 13**) ausgewählt. In der *in vitro* Proliferationsanalyse zeigte sich ein signifikant verstärktes Wachstum der ML-2 Zellen mit *HOXA10-AS* Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. **Abbildung 16**).

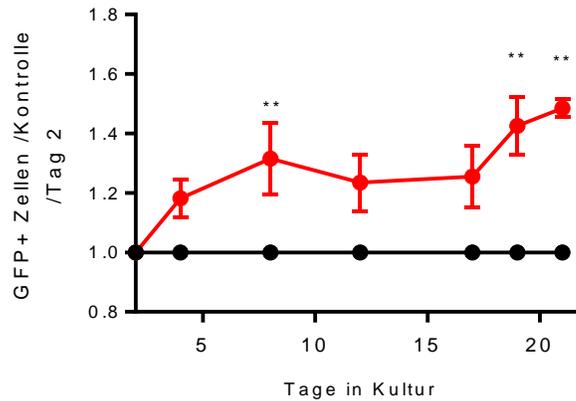


Abbildung 16: Proliferation der transduzierten (=GFP-positiven) ML-2 Zellen (Mittelwerte \pm SD (n=3), zweifaktorielle Varianzanalyse, $**p < 0.01$)

Die Patientenblasten PDX#1 stammen von einem zehnjährigen AML-Patienten und tragen eine t(9;11)-Translokation. Durch serielle *in vivo*-Transplantationen in transgene Mäuse im Rahmen von Vorarbeiten unserer Gruppe konnten die Patientenblasten kultiviert und vermehrt werden. Auch die PDX#1-Zellen präsentierten bei *HOXA10-AS* Überexpression eine signifikant verstärkte leukämische Proliferation (s. **Abbildung 17**).

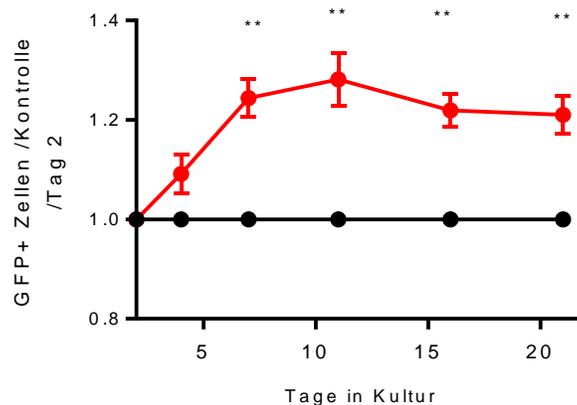


Abbildung 17: Proliferation der transduzierten (=GFP-positiven) PDX#1 Zellen (Mittelwerte \pm SD (n=3), zweifaktorielle Varianzanalyse, $**p < 0.01$)

4.2.3 Einfluss der *HOXA10-AS* Herunterregulierung auf die Leukämogenese

Im Rahmen der *loss of function* Experimente wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet: shRNA-vermittelte Herunterregulierung, CRISPR/Cas9-vermittelte Exzision und LNA-GapmeRs.

Für den shRNA-vermittelten *Knockdown* wurden zunächst mehrere shRNAs gegen *HOXA10-AS* entsprechend den SENSOR Design Regeln [96] entworfen und in den shRNA-Vektor pLKO5d.SFFV.eGFP.miR30n kloniert. Als Kontrolle (sh-Kontrolle) wurde eine shRNA gegen die Renilla-Luciferase, die in menschlichen Zellen nicht bindet, genutzt. In Anschluss an den shRNA-Reporterassay, in dem die *Knockdown*-Effizienz der entworfenen shRNAs getestet wurde, wurden drei *HOXA10-AS*-shRNAs für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Es erfolgte die lentivirale Transduktion von drei verschiedenen *KMT2A-r* Zelllinien sowie einer non-*KMT2A-r* Zelllinie mit den shRNAs. Als *KMT2A-r* Zelllinien wurden die drei Zelllinien mit der höchsten endogenen *HOXA10-AS* Expression ausgewählt: EOL-1, MOLM-13, MV4-11 (s. **Abbildung 13**). Die verwendete non-*KMT2A-r* Zelllinie NB4 zeigte hingegen eine niedrige endogene *HOXA10-AS* Expression (s. **Abbildung 13**).

Der funktionelle Einfluss der *HOXA10-AS* Herunterregulierung wurde daraufhin in Proliferationsassays untersucht. Nach 21 Tagen der *in vitro* Kultivierung zeigten die *KMT2A-r* Blasten, die mit shRNAs gegen *HOXA10-AS* transduziert worden waren, ein signifikant vermindertes Wachstum im Vergleich zu den entsprechenden non-*KMT2A-r* Zellen ($p < 0,0001$; s. **Abbildung 18**).

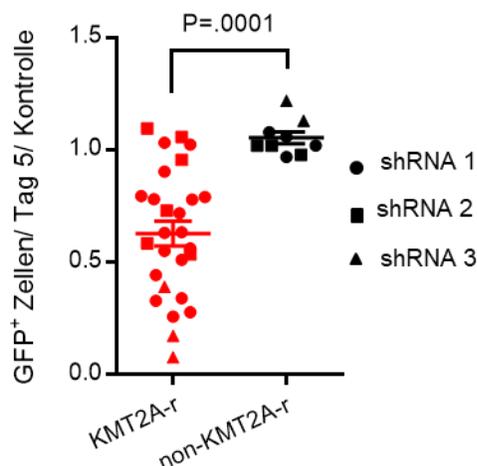


Abbildung 18: Anzahl der mit shRNAs transduzierten Zellen an Tag 21 des Proliferationsassays

(ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM ($n \geq 2$))

Der *HOXA10-AS* Knockdown in den *KMT2A-r*-Zelllinien konnte mittels qRT-PCR validiert werden (s. **Abbildung 19**). Aufgrund der äußerst geringen endogenen *HOXA10-AS* Expression ließen sich nach der Transduktion der shRNAs keine messbaren Level von *HOXA10-AS* in der non-*KMT2A-r* Kontrollzelllinie NB-4 detektieren.

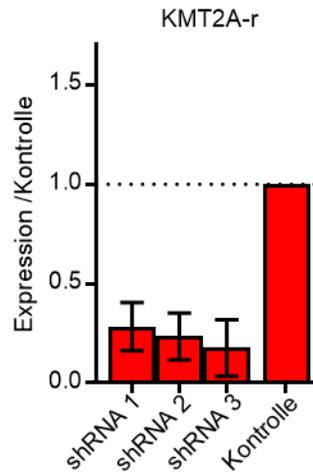


Abbildung 19: Expression von *HOXA10-AS* in den transduzierten Zellen an Tag 5 des Proliferationsassays (Mittelwerte \pm SD (n=3))

Um eine *loss of function* von *HOXA10-AS* auch auf genomischer Ebene zu untersuchen, wurde die CRISPR/Cas9-vermittelte Exzision genutzt. Dazu wurden vier verschiedene sgRNA Paare gegen die Promotorregion und den Transkriptionsstartpunkt von *HOXA10-AS* entworfen (s. **Abbildung 20**) und in unseren etablierten lentiviralen dual-sgRNA Vektor SGL40C.CRISPR.EFS.GFP kloniert. Ein nicht-bindendes sgRNA-Paar gegen Luciferase fungierte als Kontrolle.

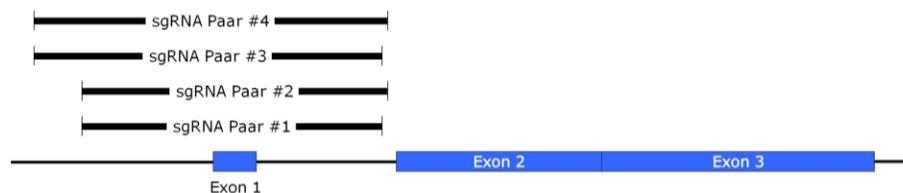


Abbildung 20: Schematische Darstellung der vier CRISPR/Cas9-vermittelten Exzisionsstellen

Vier Zelllinien (*KMT2A*-r: EOL-1, MOLM-13, MV4-11; non-*KMT2A*-r: NB-4) wurden mit Cas9 transduziert. Die Transduktion und der Proliferationsassay der Zelllinien erfolgten analog zu dem shRNA-*Knockdown*-Experiment.

Auch hierbei ergab sich für die mit *HOXA10*-AS-sgRNAs transduzierten *KMT2A*-r Zelllinien in Relation zu den entsprechenden non-*KMT2A*-r Zellen an Tag 21 der *in vitro* Kultivierung ein verringertes Wachstum ($p=0,04$; s. **Abbildung 21**).

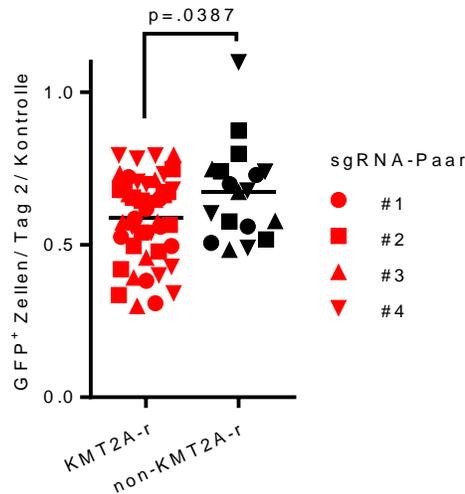


Abbildung 21: Anzahl der mit sgRNAs transduzierten Zellen an Tag 21 des Proliferationsassays
(ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM (n=3))

Aus den vorherigen *gain*- und *loss of function* Untersuchungen ergibt sich die Hypothese, dass die Expression von *HOXA10*-AS für die Aufrechterhaltung des Wachstums von *KMT2A*-r Leukämiezellen notwendig ist. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde mit LNA-GapmeRs ein weiteres *Knockdown*-Instrument genutzt: LNA-GapmeRs sind Einzelstrang-Antisense-Oligonukleotide (ASOs), die aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen (s. **Abbildung 22**). Die *Locked-Nucleic-Acids* (LNAs), die die Oligonukleotide seitlich begrenzen, binden komplementär an die Ziel-RNA und vermitteln zudem eine Resistenz gegen den Abbau der LNA-GapmeRs durch intrazelluläre Endo- und Exonukleasen. Der in der Mitte zwischen den Oligonukleotiden gelegene DNA-Strang („Gap“) dient der Aktivierung der RNase H-vermittelten Degradation der Komplexe aus Ziel-RNA und LNA-GapmeR. Zu den Vorteilen der LNA-GapmeRs zählt, dass ein Strang-spezifischer *Knockdown* erzielt wird und dass die Methode ohne lentivirale Vektoren auskommt.

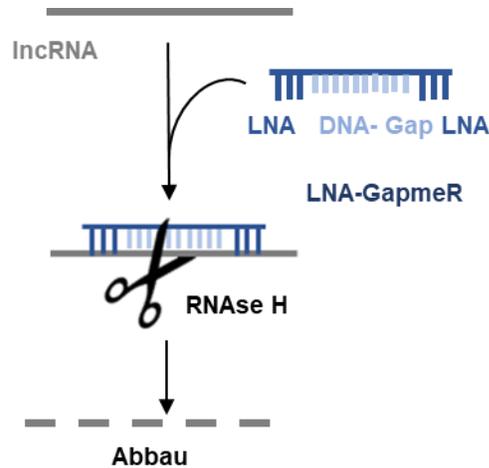


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Funktionsweise von LNA-GapmeRs

In eigenen Vorversuchen wurden die LNA-GapmeRs hinsichtlich der optimalen Konzentration, des Zeitpunkts der maximalen zellulären Aufnahme, der Lokalisation der intrazellulären Anreicherung und einer möglichen Toxizität untersucht (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Nach unassistierter Aufnahme der LNA-GapmeRs in die Zelllinien (EOL-1, MOLM-13, MV4-11, NB4) wurden *in vitro* Proliferationsassays durchgeführt. Diese ergaben für den LNA-GapmeR-vermittelten *HOXA10-AS* *Knockdown* ebenfalls ein signifikant verringertes Wachstum von *KMT2A-r* Zelllinien gegenüber non-*KMT2A-r* Zelllinien an Tag 21 ($p=0,023$; s. **Abbildung 23**).

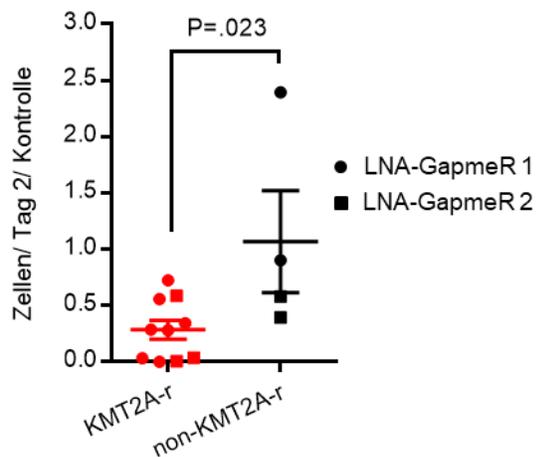


Abbildung 23: Anzahl der LNA-GapmeR behandelten Zellen an Tag 21 des Proliferationsassays

(ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM (n=2))

4.3 Funktionsmechanismus der lncRNA *HOXA10-AS*

Um erste Hinweise auf den Funktionsmechanismus von *HOXA10-AS* zu erlangen, wurde die intrazelluläre Lokalisation der lncRNA analysiert. Dazu wurden die beiden AML-Zelllinien mit der höchsten intrinsischen *HOXA10-AS* Expression, EOL-1 und MOLM-13, in ihre zellulären Kompartimente „Nukleär Chromatin-assoziiert“, „Nukleär löslich“ und „Zytoplasma“ fraktioniert, aus denen daraufhin die RNA isoliert und die Expression von *HOXA10-AS* und den Kontrollgenen (B2M, TERC, XIST) mittels qRT-PCR bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass die lncRNA innerhalb der Zelle überwiegend im Zytoplasma vorliegt (s. **Abbildung 24**).

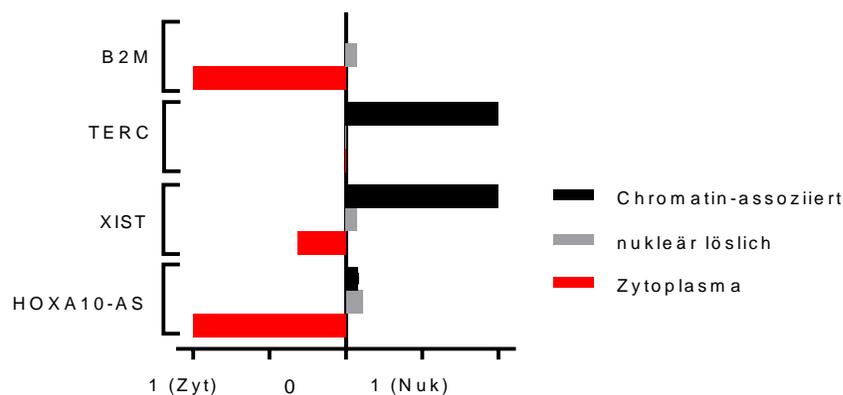


Abbildung 24: Intrazelluläre Lokalisation von *HOXA10-AS* und den Kontrollgenen (n=2)

Um zu untersuchen, inwieweit die lncRNA *HOXA10-AS* mechanistisch einen Einfluss auf die Expression der benachbarten onkogenen *HOX*-Clustergene ausübt, wurden im Rahmen der *Knockdown*-Experimente die Expressionslevel von *HOXA10*, *HOXA9* und miR-196b mittels qRT-PCR bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die shRNA-vermittelte Herunterregulierung von *HOXA10-AS* (vgl. **Abbildung 18**) die Expressionslevel der Nachbargene im Vergleich zu den Kontrollzellen in der Zelllinie EOL-1 nicht signifikant beeinflusst (s. **Abbildung 25**). In den Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 führte der *HOXA10-AS Knockdown* mittels shRNAs lediglich zu inkonsistenten Alterationen der *HOXA9* Expression, wohingegen die Expression von *HOXA10* und miR-196b ebenfalls nicht signifikant beeinflusst wurde. In NB-4 Zellen, die eine geringe endogene *HOXA10-AS* Expression aufweisen (n.d.= nicht detektierbar), waren infolge des *HOXA10-AS shRNA-Knockdown* ebenfalls keine Veränderungen in der Expression der benachbarten Gene nachweisbar (s. **Abbildung 25**).

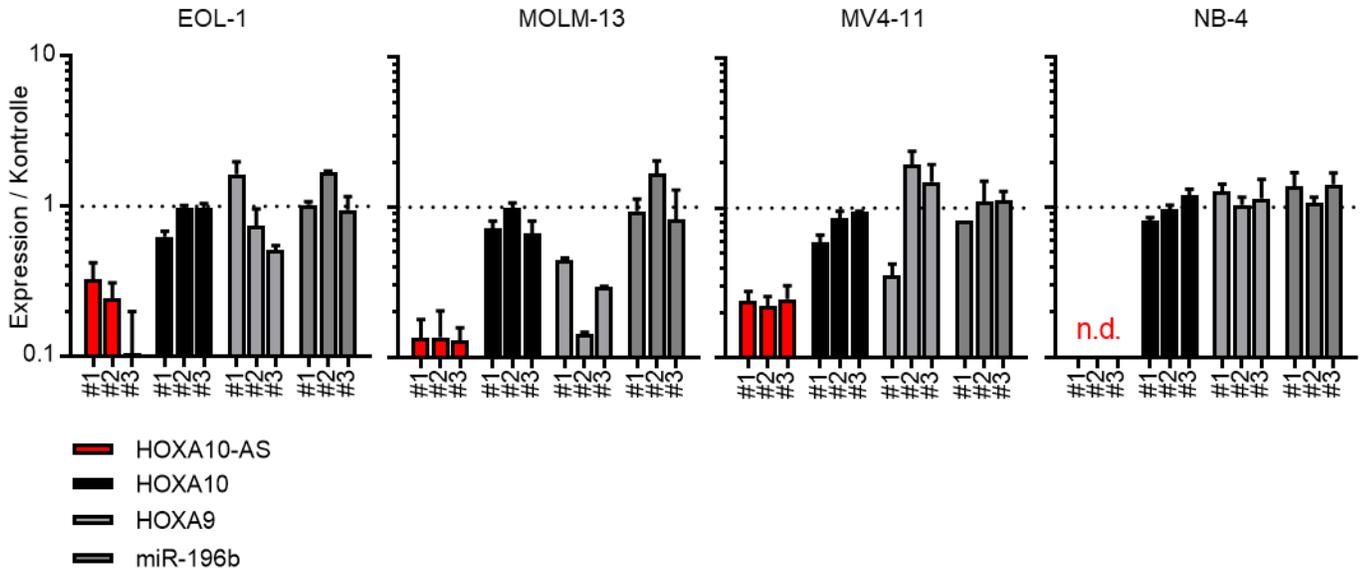


Abbildung 25: Expression der Clustergene in Zelllinien nach shRNA-Knockdown von *HOXA10-AS* (n≥2, n.d. = nicht detektierbar)

Um den Effekt von *HOXA10-AS* auf die benachbarten Gene genauer zu untersuchen, wurden infolge der genomischen Exzision der Promotorregion von *HOXA10-AS* mittels sgRNAs (vgl. **Abbildung 21**) Einzelzellklone der Zelllinien MOLM-13, MV4-11 und NB-4 gewonnen. Von der Zelllinie EOL-1 konnten keine Einzelzellklone erhalten werden. Die Exzision der entsprechenden Genregion wurde mit Sangersequenzierung nachgewiesen. In der Genexpressionsanalyse der mittels CRISPR/Cas9-Exzision modifizierten Zelllinien zeigte sich ebenfalls kein Effekt auf die Expression von *HOXA10* und *HOXA9*. Lediglich die Expression von miR-196b war infolge der *HOXA10-AS*-Exzision im Gegensatz zu den Ergebnissen des shRNA-Knockdowns vermindert (s. **Abbildung 26**).

Da ein Effekt auf die miR-196b-Expression jedoch weder infolge der *HOXA10-AS*-Überexpression in HSPCs noch infolge der shRNA-vermittelten *HOXA10-AS*-Herunterregulierung in Zelllinien nachgewiesen werden konnte, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass eine Modulation der *HOXA10-AS* Expression keinen konsistenten Einfluss auf die Genexpression der benachbarten *HOXA*-Clustergene hat.

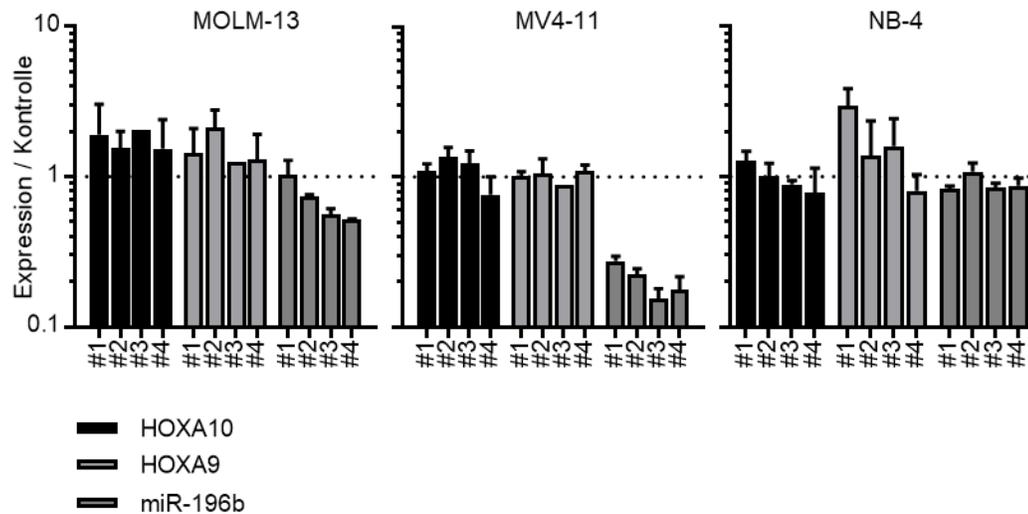


Abbildung 26: Expression der Clustergene in Zelllinien nach CRISPR/Cas9-Exzision von *HOXA10-AS* (n=2)

Sowohl die zytoplasmatische Lokalisation von *HOXA10-AS* als auch die Tatsache, dass die lncRNA keinen Effekt auf die Expression der benachbarten Gene hat, führten zu der Hypothese, dass *HOXA10-AS* mechanistisch weiter entfernte Gene *in trans* reguliert. Um die molekularen Mechanismen infolge einer hohen *HOXA10-AS* Expression zu entschlüsseln, wurde ein globales Genexpressionsprofil im Rahmen des Differenzierungsassays von *HOXA10-AS* überexprimierenden HSPCs erstellt. Die lentivirale Überexpression von *HOXA10-AS* in HSPCs verminderte signifikant die monozytäre Differenzierung (vgl. **Abbildung 10-12**). Zur Analyse der *HOXA10-AS*-induzierten transkriptionellen Veränderungen, die diesen Differenzierungsblock verursachen, wurde das Genexpressionsprofil früher monozytärer Vorläuferzellen mittels Microarray untersucht. Dazu wurden CD34⁺-HSPCs mit L_{Bid}-*HOXA10-AS*:GFP bzw. dem Kontrollvektor L_{Bid}-lnc:GFP transduziert. An Tag 5 der myelo-monozytären *in vitro* Differenzierung erfolgte die durchflusszytometrische Sortierung der GFP-positiven monozytären Progenitoren. Die frühen monozytären Vorläuferzellen wurden durch *Gating* der hohen CD11b⁻, niedrigen CD14⁻ und niedrigen CD117-Expression selektiert. Daraufhin wurde die gesamte RNA dieser Zellen isoliert und das Genexpressionsprofil mittels Microarray bestimmt (s. **Abbildung 27**).

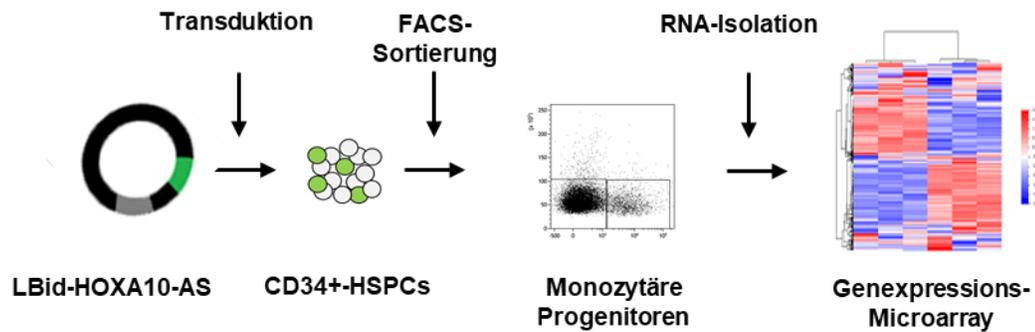


Abbildung 27: Schematischer Versuchsaufbau für die Microarray-Genexpressionsanalyse

Es konnten 42 Gene identifiziert werden, deren Expression sich zwischen *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen signifikant unterschied. Davon waren 40 Gene in den *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen heraufreguliert und 2 Gene herunterreguliert. Auch in der Microarray-Genexpressionsanalyse gehörten die Nachbargene *HOXA9* und *HOXA10* nicht zu denjenigen Genen, deren Expression durch *HOXA10-AS* beeinflusst wurde. In der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene, wurde die Gruppe der NF- κ B-Zielgene als die Gruppe der am stärksten heraufregulierten Gene identifiziert (s. **Abbildung 28**). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist oftmals in AML-Zellen, insbesondere in monozytischen/monoblastären Leukämieformen, konstitutiv aktiviert und wird daher bereits als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt untersucht. [97-99]

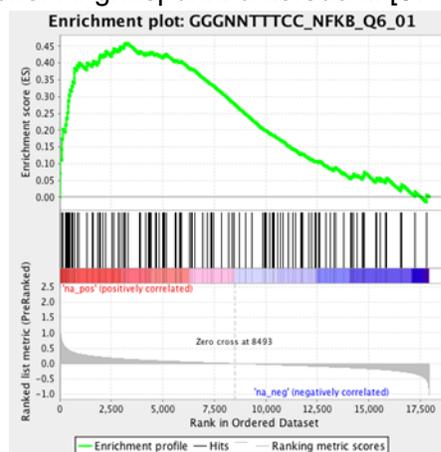


Abbildung 28: Enrichment plot von NF- κ B-Zielgenen bei *HOXA10-AS* Überexpression

Zur weiteren Validierung von NF- κ B als Zielgen des *HOXA10-AS* Funktionsmechanismus wurde die Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 an Serin 529 (pSer529) als Marker der NF- κ B Aktivierung in transduzierten ML-2 Zellen bestimmt. In *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der p65-Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollzellen (2,6-facher Anstieg, $p=0,0028$; s. **Abbildung 29**). In einem weiteren Schritt wurden die transduzierten ML-2 Zellen mit BMS-345541 behandelt. BMS-345541 ist ein Inhibitor der I κ B Kinase (IKK), welche über eine Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B α die Aktivierung des NF- κ B Signaltransduktionsweges bewirkt. Somit führt BMS-345541 zu einer verminderten Aktivität des NF- κ B Signalwegs. Nach Behandlung der ML-2 Zellen mit BMS-345541 konnte eine deutliche Reduktion der p65-Phosphorylierung als Marker der NF- κ B Aktivierung sowohl in den *HOXA10-AS* exprimierenden Zellen als auch in den Kontrollzellen nachgewiesen werden (Kontrolle: 30,3-fache Reduktion, $p=0,02$; LBid-*HOXA10-AS*: 20,6-fache Reduktion, $p=0,0005$; s. **Abbildung 31**).

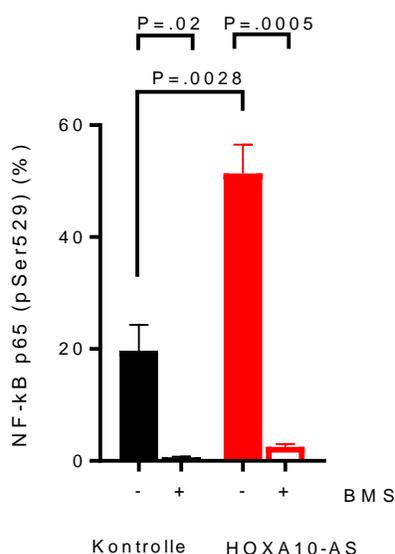


Abbildung 29: Prozentsatz der phosphorylierten p65-positiven (pSer529) ML-2-Zellen

Zudem wurde die Proliferation der transduzierten ML-2 Zellen infolge der Behandlung mit BMS-345541 untersucht. Während sich ohne BMS-345541 für die *HOXA10-AS* überexprimierenden ML-2 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ein signifikant gesteigertes Wachstum ergab (vergl. **Abbildung 16**), hob die Behandlung mit BMS-345541 diesen Proliferationsvorteil auf (s. **Abbildung 30**).

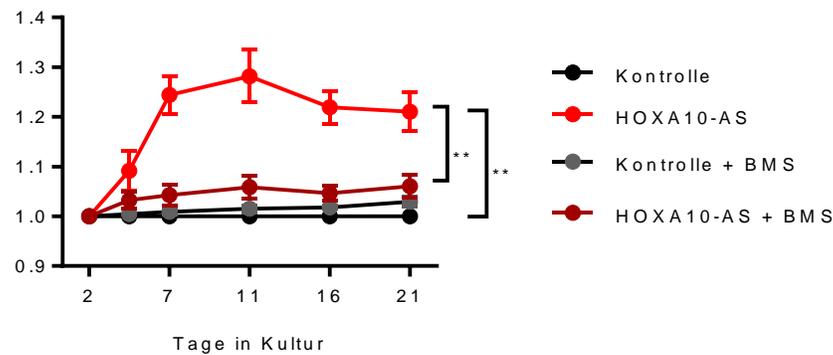


Abbildung 30: Proliferation der transduzierten ML-2 Zellen mit/ohne BMS-345541 (Mittelwerte \pm SEM (n=3), zweifaktorielle Varianzanalyse)

Auch im monozytären Differenzierungsassay bestätigte sich der Effekt von BMS-345541 auf die *HOXA10-AS* Wirkung: Der Anteil der differenzierten CD11b⁺/CD14⁺- bzw. CD14⁺/CD163⁺-*HOXA10-AS*-transduzierten Zellen stieg infolge der Behandlung mit BMS-345541 signifikant, sodass der *HOXA10-AS*-induzierte monozytäre Differenzierungsblock vollständig aufgehoben wurde (CD11b⁺/CD14⁺: 1,8-facher Anstieg, p=0,0113; CD14⁺/CD163⁺: 2,1-facher Anstieg; p= 0,0001; s. **Abbildung 31**).

Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass eine gesteigerte Expression des NF- κ B-Signalwegs in den Funktionsmechanismus der lncRNA *HOXA10-AS* involviert ist.

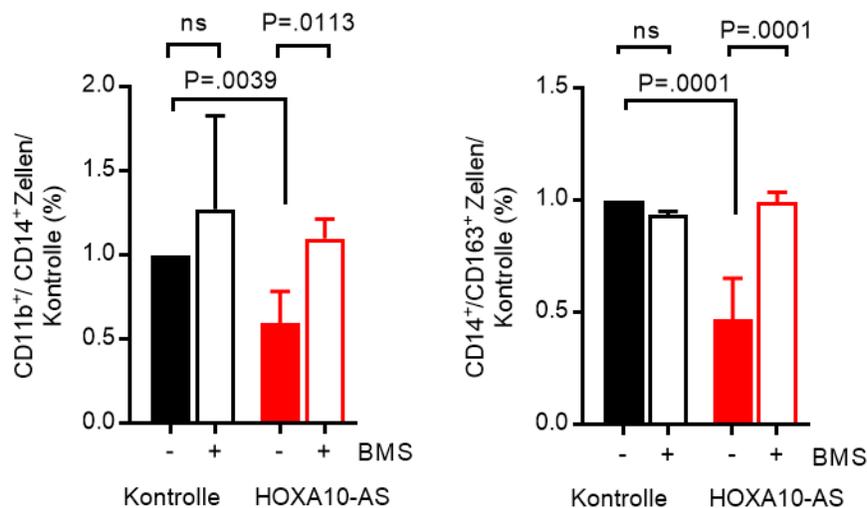


Abbildung 31: FACS-Analyse der monozytären Differenzierung mit/ohne BMS-345541 (Mittelwerte \pm SD (n \geq 3), zweifaktorielle Varianzanalyse)

4.4 *In vivo* Anwendung der *HOXA10-AS* Herunterregulierung

In Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen wurde im nächsten Schritt der Effekt eines *HOXA10-AS* *Knockdown* im Mausmodell *in vivo* getestet. Dazu wurden humane *KMT2A*-r-AML-Patientenblasten (PDX#2), die zuvor aus tertiären Xenotransplant-Mäusen isoliert worden waren, mit einer shRNA gegen *HOXA10-AS* bzw. mit einer nicht-bindenden Kontroll-shRNA transduziert. Die transduzierten Zellen wurden in einem 1:1-Verhältnis gemischt, in subletal bestrahlte quaternäre NSG-Mäuse transplantiert und in einem kompetitiven Proliferationsassay untersucht (s. **Abbildung 32**).

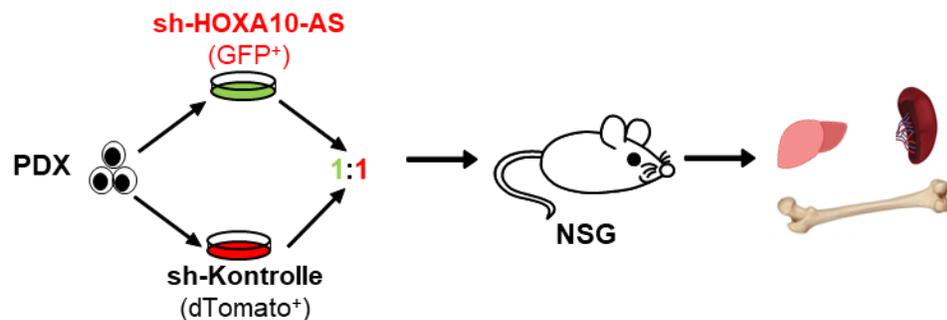


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des *in vivo* *Knockdown*

Dafür wurde der Anteil der mit der *HOXA10-AS*-shRNA (GFP⁺) bzw. der Kontroll-shRNA -transduzierten (dTomato⁺) Blasten mittels FACS zu Beginn des Versuchs in der Zellkultur (Tag 2 post-Transduktion) sowie zum Endpunkt im Knochenmark, in der Milz und in der Leber der NSG-Mäuse gemessen (s. **Abbildung 33-35**).

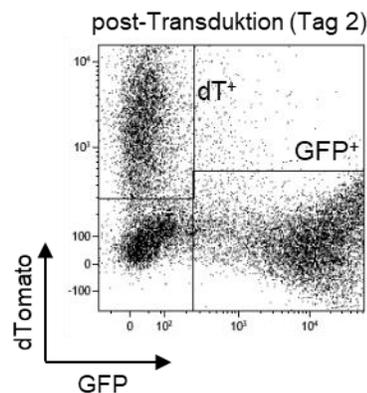


Abbildung 33: FACS-Plot der transduzierten PDX zu Beginn des Proliferationsassays

Am Endpunkt des Experiments war der Anteil der AML-Blasten, die die shRNA gegen *HOXA10-AS* enthielten, sowohl im Knochenmark ($P < 0,0001$) als auch in der Milz ($P < 0,0001$) und Leber ($P < 0,0001$) im Vergleich zu den Blasten mit der Kontroll-shRNA signifikant vermindert (s. **Abbildung 34-35**).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Abhängigkeit des Wachstums von *KMT2A*-r-AMLs von der *HOXA10-AS* Expression.

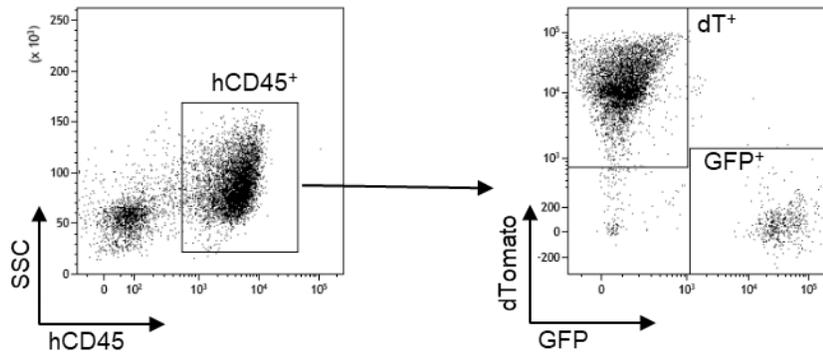


Abbildung 34: Repräsentative FACS-Plots am Endpunkt des Versuchs

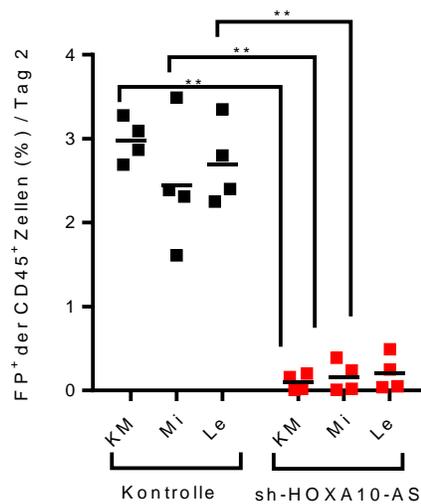


Abbildung 35: Anteil der transduzierten PDX in Knochenmark (KM), Milz (Mi) und Leber (Le)

5. Diskussion

Innerhalb der letzten Jahrzehnte konnten deutliche Fortschritte hinsichtlich der genetischen Klassifikation und der individuellen Risikostratifizierung der AML erzielt werden, wohingegen sich die Behandlungsstrategie der Erkrankung kaum weiterentwickelt hat. Es besteht folglich die dringende Notwendigkeit, molekularbiologische Erkenntnisse in neue Therapieansätze umzusetzen.

Umfangreiche genomische Studien wie das „*Cancer Genome Atlas Project*“ konnten zeigen, dass sich AML-Zellen verschiedener Patienten bezüglich ihrer molekulargenetischen Merkmale stark unterscheiden [13]. Die molekulargenetische Heterogenität der AML betrifft dabei neben den onkogenen Mutationen und deren nachgeschalteten Signalwegen auch globale Genexpressionsmuster und DNA-Methylierungsprofile der AML-Zellen [100-102]. Dabei wird ersichtlich, dass nicht nur die veränderte Expression bestimmter Proteine einen wichtigen Faktor in der komplexen Entstehung von AML darstellt, sondern dass auch Alterationen der Expression von langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) zur Leukämogenese beitragen können [73]. Von den zahlreichen lncRNAs, die in den letzten Jahren mittels moderner Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren identifiziert werden konnten, wurde bislang lediglich ein geringer Anteil funktionell untersucht.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die erstmalige Charakterisierung der lncRNA *HOXA10-AS* im Kontext der Leukämogenese und Hämatopoese.

5.1 *HOXA10-AS* in der Hämatopoese

Die präzise kontrollierte Expression der *HOX*-Gene spielt eine entscheidende Rolle für die physiologische Embryogenese und Hämatopoese [38,103]. Seitdem vor einigen Jahren zahlreiche lncRNAs innerhalb der *HOX*-Gencluster beschrieben wurden, wird vermutet, dass diese lncRNAs an der Regulation des streng kontrollierten zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters der proteinkodierenden *HOX*-Gene beteiligt sind [104]. Ein Beispiel für eine *HOX*-lncRNA, die zur Koordination der *HOX*-Gene während der Hämatopoese beiträgt, ist lncRNA *HOTAIRM1*. *HOTAIRM1* wird während der Hämatopoese unabhängig von seinem benachbarten Antisense-Gen *HOXA1* reguliert und koordiniert während der granulozytären Differenzierung die Expression verschiedener *HOX*-Gene, wie beispielsweise *HOXA1*, *HOXA4* und *HOXD13*. [76]

Der genomische Locus der hier untersuchten lncRNA *HOXA10-AS* liegt am 3' Ende des *HOXA* Clusters. Die benachbarten proteinkodierenden Gene *HOXA9* und *HOXA10* werden

in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hoch exprimiert und im Verlauf der weiteren myeloiden Differenzierung stark herunterreguliert [80]. In dieser Arbeit konnte für *HOXA10-AS* ein ähnliches Muster in der Expressionsanalyse mittels qRT-PCR gezeigt werden. Dabei wurden für die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR die PCR-Primer so ausgewählt, dass die zu detektierende Sequenz eindeutig *HOXA10-AS* zugeordnet werden kann, ohne dabei auch unbeabsichtigt die Expression der Antisense-Gene *HOXA10* oder *mir-196b* zu messen. Im Unterschied zu den Antisense-Genen *HOXA10* und *mir-196b*, die auch in frühen myeloischen Progenitorzellpopulationen noch hoch exprimiert werden, zeigte *HOXA10-AS* eine streng Stammzell-spezifische Expression. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf die von den benachbarten Genen unabhängige Regulation und Funktion der lncRNA während der Hämatopoese. Um die funktionelle Bedeutung der hohen *HOXA10-AS* Expression in hämatopoetischen Stammzellen genauer zu untersuchen, wurde die lncRNA in humanen HSCs lentiviral überexprimiert. Im anschließenden Differenzierungsassay zeigte sich mittels Durchflusszytometrie, lichtmikroskopischer Untersuchung und Koloniebildungsassay eine signifikant eingeschränkte monozytäre Differenzierung der *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen. Die Tatsache, dass die Überexpression von *HOXA10-AS* in HSCs die physiologische monozytäre Differenzierung beeinträchtigt und gleichzeitig in *KMT2A-r* AML überexprimiert wird, steht im Einklang mit der Beobachtung, dass sich *KMT2A-r* AML in Patienten überwiegend als monoblastische Leukämie (AML WHO Grad M5) präsentiert [12].

Dieser Zusammenhang ist ein erster Hinweis darauf, dass die Überexpression von *HOXA10-AS* an der Pathogenese der *KMT2A-r* AML beteiligt ist. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die lncRNA in der Hämatopoese streng stammzell-spezifisch exprimiert wird und identifizieren damit *HOXA10-AS* als einen neuen Faktor in der Homöostase von HSCs und in der Regulation der hämatopoetischen Differenzierung.

5.2 *HOXA10-AS* in der Leukämogenese

KMT2A-r AML stellt den häufigsten zytogenetischen Subtyp bei Kindern mit AML dar [15]. Eine entscheidende Gemeinsamkeit der zahlreichen unterschiedlichen *KMT2A*-Rearrangements ist, dass die *KMT2A*-Fusionsproteine die Expression der *HOX*-Gene, die physiologischerweise durch den Wildtyp des *KMT2A*-Proteins reguliert werden, abnorm steigern [41,105]. Für die Untersuchung der Rolle der im *HOXA*-Cluster lokalisierten lncRNA *HOXA10-AS* in der Leukämogenese wurde zunächst ein Expressionsprofil der lncRNA in unterschiedlichen AML-Subtypen mittels qRT-PCR erstellt. Die Expressionsanalyse ergab

eine signifikant höhere *HOXA10-AS* Expression in AML-Zelllinien mit *KMT2A*-Rearrangements oder *KMT2A*-PTD als in AML-Zelllinien anderer zytogenetischer Subgruppen. Um auszuschließen, dass die zufällige Auswahl der *KMT2A*-r und non-*KMT2A*-r Zelllinien zu einem nicht-repräsentativen Ergebnis geführt hat, wurde die *HOXA10-AS* Expression zusätzlich in einem Microarraydatensatz von Blasten pädiatrischer AML-Patienten validiert. Dabei bestätigte sich, dass *HOXA10-AS* signifikant höher in AML-Blasten mit *KMT2A*-Rearrangements exprimiert wird, als in Patientenblasten anderer zytogenetischer Subgruppen. Die spezifische Hochregulation von *HOXA10-AS* in *KMT2A*-r AML weist auf einen möglichen kontextabhängigen onkogenen Effekt der lncRNA hin. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Funktion von *HOXA10-AS* in *KMT2A*-r AML-Blasten genauer untersucht. Ein klassischer Ansatz zur funktionellen Untersuchung eines Gens ist die experimentelle Verstärkung (*gain of function*) bzw. Verminderung (*loss of function*) der Expression dieses Gens. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene komplementäre *gain*- und *loss of function* Ansätze genutzt. In einem ersten Schritt wurde *HOXA10-AS* mittels eines lentiviralen Vektorsystems in einer *KMT2A*-r Zelllinie und *KMT2A*-r Patientenblasten (beide mit moderatem endogenen *HOXA10-AS* Expressionslevel) überexprimiert. Die folgenden Wachstumsanalyse zeigte, dass die *HOXA10-AS* Überexpression zu einem signifikant gesteigerten leukämischen Wachstum führt. Für die *loss of function* Untersuchung kamen drei unterschiedliche Methoden mit dem Ziel der Herunterregulierung der *HOXA10-AS* Expression zum Einsatz: *Knockdown* mittels shRNAs, Exzision des *HOXA10-AS* Promotors mittels CRISPR/Cas9 sowie LNA-GapmeR vermittelter *Knockdown*. Dabei führte der *HOXA10-AS Knockdown* unabhängig von dem verwendeten Ansatz zu einem verminderten Wachstum von *KMT2A*-r AML-Zelllinien mit hoher endogener *HOXA10-AS* Expression.

Diese Arbeit identifiziert somit die lncRNA *HOXA10-AS* als wichtigen onkogenen Faktor in der Aufrechterhaltung von *KMT2A*-r AML.

5.3 Funktionsmechanismus von *HOXA10-AS*

Die funktionellen Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass Alterationen der *HOXA10-AS* Expression zu phänotypischen Effekten in der Hämatopoese und Leukämogenese führen. Daher wurde im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit der Funktionsmechanismus der lncRNA untersucht. Dabei bestand eine Besonderheit darin, dass *HOXA10-AS* als antisense lncRNA in einem für die Hämatopoese und Leukämogenese bereits bekannten, hochrelevanten genomischen Locus lokalisiert ist.

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass antisense Transkripte lediglich als Nebenprodukte im Rahmen der Transkription des proteinkodierenden sense Gens entstehen und damit „transkriptionellen Abfall“ darstellen, sind mittlerweile zahlreiche Beispiele von antisense lncRNAs bekannt, die weit darüber hinaus eigenständige Funktionen ausüben [106]. Dabei lassen sich Effekte, die durch den Akt der antisense Transkription an sich ausgelöst werden, von Effekten, die durch eigenständige Interaktionen der antisense lncRNAs vermittelt werden, abgrenzen [106,107]. Zusätzlich lassen sich die funktionellen Effekte von antisense lncRNAs in Wirkungen auf lokal benachbarte Gene (*in cis*) und in Wirkungen auf weiter entfernte Gene (*in trans*) unterteilen. Genau wie andere lncRNAs sind antisense lncRNAs aufgrund ihrer unterschiedlichen strukturellen Domänen in der Lage, mit DNA, RNA und Proteinen zu interagieren [107,108]. Dies ermöglicht es ihnen grundsätzlich, alle Stadien der Genexpression proteinkodierender Gene zu beeinflussen - von der prä-transkriptionellen Chromatinmodifikation über die direkte Regulation der Transkription bis hin zur Wirkung auf die post-transkriptionelle mRNA-Stabilität oder die Translation [106].

Zwei Beispiele für antisense lncRNAs mit gut untersuchten Funktionsmechanismen die die Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen, sind die *HOX*-lncRNAs *HOTAIR* und *HOTTIP*. *HOTAIR* ist eine antisense lncRNA des *HOXC* Locus, die einerseits selbst an unterschiedlichen Loci im Genom bindet und andererseits zusätzlich den chromatinmodifizierenden Faktor PRC2 rekrutiert, was zu einer verminderten Expression von *HOXD* Genen *in trans* führt [74,109]. *HOTTIP* ist als antisense lncRNA im *HOXA* Cluster lokalisiert und aktiviert durch Veränderung der lokalen dreidimensionalen Chromatinstruktur und Aktivierung des WDR5/MLL-Komplexes die Transkription der benachbarten *HOXA* Gene *in cis* [63].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine mögliche Wirkung der antisense lncRNA *HOXA10-AS* auf die benachbarten sense Gene *HOXA9*, *HOXA10* und *mir-196b* untersucht. Für alle dieser genannten Gene konnte bereits eine essentielle Rolle in der physiologischen Hämatopoese und in der Entstehung von AML gezeigt werden [35,110,111]. Die Onkogene *HOXA9* und *HOXA10* werden in der frühesten Subpopulation von CD34⁺-HSC hoch exprimiert und während der weiteren hämatopoetischen Differenzierung stark herunterreguliert [35]. Die Überexpression von *Hoxa10* in HSPCs führt in Mausmodellen zu einer Vermehrung von unreifen Blasten und einer Steigerung der monozytären Differenzierung, während die Erythropoese, Lymphopoese und Megakaryopoese gehemmt

werden [36,112-114]. Bereits die alleinige Überexpression von *Hoxa10* initiiert dadurch die Leukämogenese [114]. Auch die Überexpression von *Hoxa9* zusammen mit dem Kofaktor Meis1 führt in primären Knochenmarkzellen im Mausmodell zur leukämischen Transformation [115]. Die onkogene microRNA miR-196b wird während der Hämatopoese analog zu *HOXA10* exprimiert [83]. Zudem findet sich in akuten Leukämien eine miR-196b-Überexpression in Subtypen mit *KMT2A*-Aberrationen [84] und in anderen Subtypen mit einer gesteigerten *HOX* Expression [85]. *KMT2A*-Fusionsproteine aktivieren dabei die Transkription von mir-196b direkt mittels H3K79 Methylierung [86].

In Hinblick auf einen möglichen Funktionsmechanismus der lncRNA *HOXA10-AS in cis* wurde zunächst der Effekt der veränderten *HOXA10-AS* Expression auf die benachbarten *HOX*-Gene und miR-196b untersucht. Weder der shRNA-vermittelte *Knockdown* von *HOXA10-AS* noch die CRISPR/Cas9-induzierte Exzision des *HOXA10-AS* Promotors hatten eine veränderte Expression von *HOXA9* und *HOXA10* zur Folge. Während der shRNA-vermittelte *Knockdown* auch auf die Expression von miR-196b keinen Effekt hatte, war infolge der sgRNA-induzierten Exzision eine verminderte Expression der microRNA zu beobachten. Als Erklärung dafür ist wahrscheinlich, dass im Rahmen der Exzision des *HOXA10-AS* Promotors auch regulatorische Elemente von miR-196b mit herausgeschnitten wurden. Auch die experimentelle Überexpression von *HOXA10-AS* in HSPCs bzw. ML-2 Zellen hatte keine signifikante Änderung der Expression der sense Gene *HOXA10* und miR-196b zur Folge. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Alterationen der *HOXA10-AS* Expression keinen bzw. keinen konsistenten Effekt auf die Expression der benachbarten Onkogene haben und deuten damit auf einen alternativen Funktionsmechanismus der lncRNA hin, der unabhängig von einer regulatorischen Funktion *in cis* ist.

Einen weiteren Hinweis auf den Funktionsmechanismus von lncRNAs liefert die Analyse ihrer subzellulären Lokalisation. Dabei zeigte sich, dass *HOXA10-AS* überwiegend im Zytoplasma vorliegt. Dies unterstützt die Hypothese, dass *HOXA10-AS* keinen direkten Effekt auf transkriptionelle Prozesse *in cis*, die im Zellkern stattfinden, hat, sondern auf posttranskriptioneller Ebene wirkt und damit eine von den benachbarten *HOX*-Genen unabhängige Funktion ausübt.

Um dieser Hypothese weiter nachzugehen und mögliche Signalwege, die in den Funktionsmechanismus von *HOXA10-AS* involviert sind, aufzudecken, wurde ein Expressionsprofil von *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen mittels Microarray erstellt. Da die *HOXA10-AS* Überexpression in den phänotypischen Untersuchungen zu einem deutlichen Block der monozytären Differenzierung geführt hat, wurde die Population der

monozytären Progenitorzellen aus der Gesamtheit der transduzierten HSPCs selektiert. In diesen Zellen wurden mittels Microarray-Genexpressionsanalyse Veränderungen im Expressionsmuster tausender globaler Gene untersucht, die infolge der *HOXA10-AS* Überexpression entstehen und die daher möglicherweise im Zusammenhang mit dem Funktionsmechanismus der lncRNA stehen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in den *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen zahlreiche Gene heraufreguliert werden, die eine Rolle in der Immunantwort und der hämatopoetischen Differenzierung spielen. Die Gruppe der am stärksten durch die *HOXA10-AS* Überexpression heraufregulierten Gene war dabei die Gruppe der NF- κ B-Zielgene.

NF- κ B ist ein dimerer, aus zwei Transkriptionsfaktoren bestehender Proteinkomplex, der über nachgeschaltete Signalwege die Expression zahlreicher Gene aktiviert. NF- κ B ist als wichtiger Regulator der Immunantwort, der Entzündungsreaktion und der Differenzierung bekannt und induziert die Expression proliferativer und anti-apoptotischer Gene [116-118]. Auch ein Einfluss der *NF- κ B* Expression auf die Hämatopoese und Leukämogenese konnte bereits gezeigt werden. Primitive CD34⁺-HSCs exprimieren *NF- κ B* lediglich auf einem basalen Level [119]. Die regelrechte Regulation des NF- κ B-Signalwegs spielt zudem eine entscheidende Rolle für die monozytäre und granulozytäre Differenzierung [119]. In AML Zellen liegt eine konstitutive Aktivierung von *NF- κ B* vor [97,99]. Interessanterweise zeigen die AML-Subtypen FAB M4 und M5, also die monozytären AML-Subtypen, eine stärkere *NF- κ B* Aktivierung als die weniger differenzierten AML-Subtypen M1 und M2 [97]. Der Proteasom-Inhibitor MG-132, ein bekannter NF- κ B-Inhibitor, führt in primären AML-Zellen zu einer Induktion der Apoptose, wohingegen das Wachstum normaler HSCs nicht beeinträchtigt wird [99]. Damit wurde NF- κ B bereits früh als mögliche Zielstruktur in der Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung der AML identifiziert. Insbesondere für AML mit *KMT2A*-Rearrangements konnte gezeigt werden, dass der aktivierte NF- κ B-Signalweg entscheidend zur Proliferation und zum Differenzierungsblock der Blasten beiträgt. So bewirkt der *Knockdown* von verschiedenen Kinasen oder Phosphatasen, die Teil des NF- κ B-Signalwegs sind, eine substantielle Wachstumshemmung von humanen und murinen *KMT2A*-r AML-Zellen [98]. Entgegengesetzt führt die Überexpression eines der Hauptkomponenten des NF- κ B-Proteinkomplexes, RelA, zu einer verstärkten Proliferation von *KMT2A*-r AML-Zellen [98]. Die mechanistische Ursache dieser phänotypischen Effekte ist eine direkte epigenetische Regulation der *KMT2A*-Zielgene durch den NF- κ B-Signalweg. Beispielsweise führt die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs durch einen I κ K-Inhibitor zu einer

Verminderung der epigenetischen Modifikationen an den Promotoren der primären *KMT2A*-Zielgene *Hoxa9* und *Meis1* und resultiert damit in einer verminderten Expression von *Hoxa9* und *Meis1* [98].

Zusammenfassend ist NF- κ B ein Transkriptionsfaktor, der während der Hämatopoese die monozytäre und granulozytäre Differenzierung reguliert und im Rahmen der Leukämogenese die Proliferation von AML, insbesondere der AML M4 und M5, steigert. In *KMT2A-r* AML trägt die gesteigerte NF- κ B-Aktivität mittels epigenetischer Aktivierung der *KMT2A*-Zielgene zur Pathogenese der Erkrankung bei.

Die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalyse, die zeigen, dass lncRNA *HOXA10-AS* die Zielgene des NF- κ B-Signalwegs aktiviert, stehen demnach im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Assoziation der lncRNA mit der Aufrechterhaltung von *KMT2A-r* AML und mit der Regulation der monozytären Differenzierung herstellen.

Zur weiteren Bestätigung von NF- κ B als Teil des *HOXA10-AS* Funktionsmechanismus wurde zunächst in ML-2 Zellen die Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 am Serin 529 gemessen. Die NF- κ B p65 Ser529-Phosphorylierung dient dabei als Marker der NF- κ B-Aktivierung [120]. In ML-2 Zellen, in denen *HOXA10-AS* lentiviral überexprimiert wurde, konnte eine signifikant gesteigerte p65-Phosphorylierung und damit eine gesteigerte NF- κ B-Aktivität gezeigt werden. In einem nächsten Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern sich die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs auf die funktionellen Effekte der *HOXA10-AS* Überexpression auswirkt. Dazu wurden Zellen mit bzw. ohne lentiviraler *HOXA10-AS* Überexpression mit dem I κ B-Kinase-Inhibitor BMS-345541 behandelt. In *HOXA10-AS* überexprimierenden HSPCs führte die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs dazu, dass der durch die lncRNA induzierte monozytäre Differenzierungsblock wieder aufgehoben wurde. In ML-2 Zellen zeigte sich infolge der I κ B-Kinase-Inhibition eine Aufhebung des Proliferationsvorteils von *HOXA10-AS* überexprimierenden Zellen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit mittels Microarray-Genexpressionsanalyse und p65-Phosphorylierungsanalyse gezeigt werden, dass die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs eine wichtige Komponente des *HOXA10-AS* Funktionsmechanismus ist. Die Tatsache, dass eine Inhibition des NF- κ B-Signalwegs die funktionellen Effekte von *HOXA10-AS* wieder rückgängig macht, bestätigt NF- κ B als wichtige Zielstruktur des *HOXA10-AS*

Funktionsmechanismus sowohl im Kontext der Hämatopoese als auch in der Leukämogenese.

Zur genaueren Entschlüsselung des Funktionsmechanismus der lncRNA sind künftig weitere Untersuchungen hinsichtlich der *HOXA10-AS* Bindungspartner und hinsichtlich der Interaktionen mit einzelnen Komponenten des NF- κ B-Signalwegs notwendig, beispielsweise mittels ChIRP (*chromatin isolation by RNA purification*), RIP (*RNA immunoprecipitation*) oder CLIP (*crosslinked immunoprecipitation*) [121-123].

5.4 Klinische Relevanz von *HOXA10-AS*

LncRNAs wirken als wichtige Faktoren in der Regulation der Genexpression und sind in zahlreiche zelluläre Prozesse, in die physiologische Differenzierung und die Pathogenese unterschiedlicher Krankheiten involviert. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die lncRNA *HOXA10-AS* entscheidend für die regelrechte Hämatopoese ist und an der Aufrechterhaltung von *KMT2A-r* AML beteiligt ist. Ziel dieser Arbeit ist es darüber hinaus, die funktionellen und mechanistischen Erkenntnisse in die klinische Praxis zu transferieren. Dazu wurde mit einem *in vivo* Mausmodell untersucht, welchen Effekt ein *HOXA10-AS* shRNA-*Knockdown* in humanen AML-Patientenblasten hat, um die lncRNA als mögliches therapeutisches Ziel zu implementieren. Dabei konnte infolge der *HOXA10-AS* Herunterregulierung eine deutliche Reduktion der Blasten im Knochenmark, in der Leber und in der Milz erzielt werden. Dies bestätigt die Relevanz von *HOXA10-AS* in der Pathogenese der *KMT2A-r* AML und zeigt, dass die lncRNA einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien darstellt. In den vorherigen *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit konnte mit drei unterschiedlichen Ansätzen der *HOXA10-AS* Herunterregulierung das Wachstum vom *KMT2A-r* AML-Blasten vermindert werden. Einer dieser Ansätze ist die Applikation von LNA-GapmeRs gegen *HOXA10-AS*. LNA-GapmeRs sind einzelsträngige modifizierte Antisense-Oligonukleotide (ASOs), die eine strangspezifische Herunterregulierung ermöglichen. Die *Locked-Nucleic Acids* (LNAs), die die Oligonukleotide seitlich begrenzen, binden den Zielstrang mittels komplementärer Basenpaarung und vermitteln zudem eine Resistenz gegen intrazelluläre Endo- und Exonukleasen. Der in der Mitte des Oligonukleotids gelegene DNA-Strang („Gap“) dient der Aktivierung der RNase H-vermittelten Degradation der DNA-RNA-Komplexe. LNA-GapmeRs werden über eine unassistierte Aufnahme (Gymnosis) ohne die Notwendigkeit von viralen Vektorsystemen, von Verpackungsmolekülen oder von

Transfektionsmedien in die Zellen eingebracht [124]. Somit stellen LNA-GapmeRs eine vielversprechende Methode für die direkte therapeutische Herunterregulation von nicht-kodierenden RNAs dar. In verschiedenen Mausmodellen wurde ein therapeutischer Effekt von LNA-GapmeRs bzw. ASOs bereits untersucht: So führte der *Knockdown* der lncRNA *Malat1* in einem Mamma-Karzinom-Mausmodell zu einem verringerten Tumorwachstum, einer verstärkten Differenzierung in zystische Tumoren und einer verminderten Tumormetastasierung [125]. Des Weiteren resultierte die Behandlung von Mäusen mit Neuroblastom mit ASOs gegen die lncRNA *IncUSMycN* ebenfalls in einem signifikant reduzierten Tumorwachstum [126]. Verschiedene ASOs bzw. LNA-GapmeRs gegen einzelne mRNAs und microRNAs werden bereits in klinischen Studien getestet oder sind bereits für die klinische Anwendung zugelassen: So wurde Mipomirsen, ein modifiziertes ASO, das die mRNA für ApoB-100 bindet, bereits für die Behandlung von homozygoter familiärer Hypercholesterinämie zugelassen [127]. Ein weiteres ASO, das schon in der klinischen Praxis genutzt wird, ist Eteplirsen, das die prä-mRNA von Dystrophin bindet und für die Behandlung der Muskeldystrophie Duchenne eingesetzt wird [128]. Beispiele für LNA-GapmeR-basierte Wirkstoffe, die an nicht-kodierende RNAs binden, sind Miravirsen und Cobomarsen. Miravirsen reguliert die microRNA miR-122 herunter und wird aktuell in klinischen Phase II Studien zur Behandlung von Hepatitis C getestet [129]. Cobomarsen bindet miR-155 und wird derzeit in klinischen Phase II Studien zur Therapie von Patienten mit Kutanem T-Zell-Lymphom geprüft (#NCT03713320, #NCT03837457).

Auch wenn aktuell noch keine klinischen Studien mit ASOs bzw. LNA-GapmeRs gegen lncRNAs zur Verfügung stehen, bestätigen die hier beispielhaft aufgeführten Wirkstoffe, die bereits zugelassen sind oder in klinischen Studien erprobt werden, das therapeutische Potential von Antisense-Molekülen gegen RNAs. Da die Rolle der gesteigerten Expression der lncRNA *HOXA10-AS* für die Pathogenese von *KMT2A-r* AML in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellen LNA-GapmeRs gegen *HOXA10-AS* eine neue potentielle Therapiestrategie in der Behandlung von AML bei Kindern dar.

6. Zusammenfassung

Die zeitlich und räumlich hochspezifische Expression der *HOX*-Gene ist essentiell für die regelrechte Hämatopoese. Dementsprechend trägt die Deregulation der *HOX* Genexpression durch *KMT2A*-Aberrationen zur Entstehung von akuten Leukämien bei. Innerhalb der *HOX*-Cluster befinden sich Gene für zahlreiche lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs), die während der Differenzierung im gleichen spezifischen Muster exprimiert werden, wie die benachbarten proteinkodierenden Gene. Die Rolle der *HOX*-lncRNAs ist bislang nicht vollständig geklärt.

Thema dieser Arbeit ist die erstmalige Charakterisierung der lncRNA *HOXA10-AS* im Kontext der Hämatopoese und Leukämogenese. Die lncRNA, die antisense zu den Onkogenen *HOXA10* und mir-196b im *HOXA*-Cluster lokalisiert ist, wird in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und in akuter myeloischer Leukämie mit *KMT2A*-Rearrangements (*KMT2A-r* AML) hoch exprimiert. Die experimentelle ektopische Überexpression von *HOXA10-AS* beeinträchtigt die normale monozytäre Differenzierung in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.

Mittels shRNA- und LNA-GapmeR-vermittelter Herunterregulierung und CRISPR/Cas9-vermittelter Exzision sowie lentiviraler Überexpression konnte zudem gezeigt werden, dass *HOXA10-AS* eine onkogene Rolle in der Pathogenese von *KMT2A-r* AML ausübt. Im Mausmodell führt die Behandlung von humanen *KMT2A-r* Patientenblasten mit shRNAs gegen *HOXA10-AS* zu einer deutlichen Reduktion der leukämischen Proliferation.

Als Funktionsmechanismus der zytoplasmatisch lokalisierten lncRNA wurde eine Wirkung auf die Nachbargene *HOXA10* und mir-196b ausgeschlossen und eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs nachgewiesen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die lncRNA *HOXA10-AS* eine wichtige Rolle in der Homöostase von HSCs spielt und eine onkogene Funktion in der Aufrechterhaltung von *KMT2A-r* AML ausübt. Daher stellt *HOXA10-AS* eine potentielle Zielstruktur für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien für die Behandlung von *KMT2A-r* AML dar.

Literaturverzeichnis

- (1) Al-Kershhi S, Bhayadia R, Ng M, Verboon L, Emmrich S, Gack L, et al. The stem cell-specific long noncoding RNA HOXA10-AS in the pathogenesis of KMT2A-rearranged leukemia. *Blood Adv* 2019 Dec 23;3(24):4252-4263.
- (2) Robert-Koch-Institut ZfK. Krebs in Deutschland 2013/2014. Berlin. 2017.
- (3) Rasche M, Zimmermann M, Borschel L, Bourquin JP, Dworzak M, Klingebiel T, et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia* 2018 Oct;32(10):2167-2177.
- (4) Pulte D, Jansen L, Castro FA, Krilaviciute A, Katalinic A, Barnes B, et al. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J Cancer* 2016 Sep 15;139(6):1289-1296.
- (5) Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin.* ; 2018.
- (6) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976 08;33(4):451-458.
- (7) Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016 May 19;127(20):2391-2405.
- (8) Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017 Jan 26;129(4):424-447.
- (9) Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2018.
- (10) Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Jr, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med* 2018 Jan;24(1):103-112.
- (11) Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol* 2010 Jun 1;28(16):2674-2681.
- (12) von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 2010 06/01;28(0732-183; 16):2682-2689.

- (13) Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013 May 30;368(22):2059-2074.
- (14) Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, 3rd, Patel Y, Harden A, et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Dec 1;88(23):10735-10739.
- (15) Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* 1999 Dec 1;94(11):3707-3716.
- (16) Pui CH, Raimondi SC, Srivastava DK, Tong X, Behm FG, Razzouk B, et al. Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000 Apr;14(4):684-687.
- (17) Chessells JM, Harrison CJ, Kempster H, Webb DK, Wheatley K, Hann IM, et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia* 2002 May;16(5):776-784.
- (18) Papaemmanuil E, Dohner H, Campbell PJ. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016 Sep 1;375(9):900-901.
- (19) Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* 2009 09/17;114(12):2489-2496.
- (20) Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 1993 May 27;363(6427):358-360.
- (21) Gill Super HJ, Rothberg PG, Kobayashi H, Freeman AI, Diaz MO, Rowley JD. Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. *Blood* 1994 Feb 1;83(3):641-644.
- (22) Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, et al. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* 1993 Dec 15;82(12):3705-3711.
- (23) Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Apr 25;97(9):4790-4795.

- (24) Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet* 2015 Apr;47(4):330-337.
- (25) Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 2002 Nov;10(5):1119-1128.
- (26) Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992 Nov 13;71(4):691-700.
- (27) Reichel M, Gillert E, Nilson I, Siegler G, Greil J, Fey GH, et al. Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 1998 Dec 10;17(23):3035-3044.
- (28) Meyer C, Burmeister T, Groger D, Tsaur G, Fehina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* 2018 Feb;32(2):273-284.
- (29) Lavalley VP, Baccelli I, Kros J, Wilhelm B, Barabe F, Gendron P, et al. The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias. *Nat Genet* 2015 Sep;47(9):1030-1037.
- (30) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):41-47.
- (31) Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol* 2007 Oct 26;5:47-7007-5-47.
- (32) Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Boncinelli E, Duboule D. The Hox-4.8 gene is localized at the 5' extremity of the Hox-4 complex and is expressed in the most posterior parts of the body during development. *Mech Dev* 1991 Dec;36(1-2):3-13.
- (33) Davidson DR, Crawley A, Hill RE, Tickle C. Position-dependent expression of two related homeobox genes in developing vertebrate limbs. *Nature* 1991 Aug 1;352(6334):429-431.
- (34) Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 2002 Jan;30(1):49-57.
- (35) Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec 6;91(25):12223-12227.

- (36) Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J, Rosten P, Hogge DE, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 2001 Apr 15;97(8):2286-2292.
- (37) Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W, Fong S, Chrobak D, Ginzinger D, et al. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1456-1466.
- (38) Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 2013 Apr;27(5):1000-1008.
- (39) Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, Zon LI, Korsmeyer SJ. An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 2004 Nov 23;14(22):2063-2069.
- (40) Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* 2007 Sep 13;1(3):324-337.
- (41) Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 2002 Nov;10(5):1107-1117.
- (42) Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 1992 Nov 13;71(4):701-708.
- (43) Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* 2005 Apr 22;121(2):167-178.
- (44) Cheung N, Chan LC, Thompson A, Cleary ML, So CW. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2007 Oct;9(10):1208-1215.
- (45) Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, et al. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 2008 Nov 4;14(5):355-368.
- (46) Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, et al. Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *J Clin Invest* 2006 Oct;116(10):2707-2716.
- (47) Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 2002 Jan 1;99(1):121-129.
- (48) Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* 2003 Sep 15;17(18):2298-2307.

- (49) Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, et al. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002 Feb;16(2):186-195.
- (50) Tholouli E, MacDermott S, Hoyland J, Yin JL, Byers R. Quantitative multiplex quantum dot in-situ hybridisation based gene expression profiling in tissue microarrays identifies prognostic genes in acute myeloid leukaemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 Aug 24;425(2):333-339.
- (51) Gao L, Sun J, Liu F, Zhang H, Ma Y. Higher expression levels of the HOXA9 gene, closely associated with MLL-PTD and EZH2 mutations, predict inferior outcome in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* 2016 Feb 9;9:711-722.
- (52) Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen W, et al. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 2008 Nov;22(11):2041-2047.
- (53) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
- (54) Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012 Sep 6;489(7414):101-108.
- (55) Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 2014 Mar 27;157(1):77-94.
- (56) Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet* 2015 Mar;47(3):199-208.
- (57) Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012 Sep;22(9):1775-1789.
- (58) Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 2007 Mar;29(3):288-299.
- (59) Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009 Mar 12;458(7235):223-227.
- (60) Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* 2006 May 15;20(10):1268-1282.
- (61) Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996 Jan 11;379(6561):131-137.

- (62) Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Jul 14;106(28):11667-11672.
- (63) Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 2011 Apr 7;472(7341):120-124.
- (64) Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science* 2008 Dec 12;322(5908):1717-1720.
- (65) Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 2008 Jul 3;454(7200):126-130.
- (66) Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 2010 Sep 24;39(6):925-938.
- (67) Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 2014 Jan;15(1):7-21.
- (68) Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011 Nov 18;12(12):861-874.
- (69) Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* 2015 Nov;21(11):1253-1261.
- (70) Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 2008 Jul;14(7):723-730.
- (71) Reik W, Brown KW, Slatter RE, Sartori P, Elliott M, Maher ER. Allelic methylation of H19 and IGF2 in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 1994 Aug;3(8):1297-1301.
- (72) Moran I, Akerman I, van de Bunt M, Xie R, Benazra M, Nammo T, et al. Human beta cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes. *Cell Metab* 2012 Oct 3;16(4):435-448.
- (73) Schwarzer A, Emmrich S, Schmidt F, Beck D, Ng M, Reimer C, et al. The non-coding RNA landscape of human hematopoiesis and leukemia. *Nat Commun* 2017 Aug 9;8(1):218-017-00212-4.
- (74) Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007 06/29;129(7):1311-1323.

- (75) Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010 Apr 15;464(7291):1071-1076.
- (76) Zhang X, Lian Z, Padden C, Gerstein MB, Rozowsky J, Snyder M, et al. A myelopoiesis-associated regulatory intergenic noncoding RNA transcript within the human HOXA cluster. *Blood* 2009 Mar 12;113(11):2526-2534.
- (77) Zhao H, Zhang X, Frazao JB, Condino-Neto A, Newburger PE. HOX antisense lincRNA HOXA-AS2 is an apoptosis repressor in all trans retinoic acid treated NB4 promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 2013 Oct;114(10):2375-2383.
- (78) Botti G, De Chiara A, Di Bonito M, Cerrone M, Malzone MG, Collina F, et al. Noncoding RNAs within the HOX gene network in tumor pathogenesis and progression. *J Cell Physiol* 2018 Jan;234(1):395-413.
- (79) Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res* 2019 Jan 8;47(D1):D745-D751.
- (80) Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999 May;13(5):687-698.
- (81) Miller BG, Stamatoyannopoulos JA. Integrative meta-analysis of differential gene expression in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2010 Mar 1;5(3):e9466.
- (82) Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, et al. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 2009 04/02;113(14):3314-3322.
- (83) Coskun E, von der Heide EK, Schlee C, Kuhn A, Gokbuget N, Hoelzer D, et al. The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2011 Feb;35(2):208-213.
- (84) Schotte D, Chau JC, Sylvester G, Liu G, Chen C, van der Velden VH, et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009 Feb;23(2):313-322.
- (85) Schotte D, Lange-Turenhout EA, Stumpel DJ, Stam RW, Buijs-Gladdines JG, Meijerink JP, et al. Expression of miR-196b is not exclusively MLL-driven but is especially linked to activation of HOXA genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010 Oct;95(10):1675-1682.
- (86) Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun* 2012 Feb 21;3:688.

- (87) Xu L, Guo Y, Yan W, Cen J, Niu Y, Yan Q, et al. High level of miR-196b at newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia predicts a poor outcome. *EXCLI J* 2017 Mar 7;16:197-209.
- (88) Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b: Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2018 Apr 1;36(10):1007-1016.
- (89) Klusmann JH, Li Z, Bohmer K, Maroz A, Koch ML, Emmrich S, et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Genes Dev* 2010 03/01;24(5):478-490.
- (90) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-408.
- (91) Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell* 2012 May 11;149(4):819-831.
- (92) Emmrich S, Rasche M, Schoning J, Reimer C, Keihani S, Maroz A, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGFbeta and Wnt signaling. *Genes Dev* 2014 04/15;28(8):858-874.
- (93) Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, Hopfgartner B, Muhar M, Roth M, et al. An Optimized microRNA Backbone for Effective Single-Copy RNAi. *Cell Rep* 2013 12/26;5(6):1704-1713.
- (94) Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014 Sep;32(9):941-946.
- (95) Reimer J, Knoss S, Labuhn M, Charpentier EM, Gohring G, Schlegelberger B, et al. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells in vivo. *Haematologica* 2017 Sep;102(9):1558-1566.
- (96) Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, Chang K, Malone CD, Dickins RA, et al. Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell* 2011 Mar 18;41(6):733-746.
- (97) Baumgartner B, Weber M, Quirling M, Fischer C, Page S, Adam M, et al. Increased I kappa B kinase activity is associated with activated NF-kappa B in acute myeloid blasts. *Leukemia* 2002 Oct;16(10):2062-2071.
- (98) Kuo HP, Wang Z, Lee DF, Iwasaki M, Duque-Afonso J, Wong SH, et al. Epigenetic roles of MLL oncoproteins are dependent on NF-kappa B. *Cancer Cell* 2013 Oct 14;24(4):423-437.

- (99) Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001 Oct 15;98(8):2301-2307.
- (100) Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004 Apr 15;350(16):1605-1616.
- (101) Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010 Jan 19;17(1):13-27.
- (102) Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004 Apr 15;350(16):1617-1628.
- (103) Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Brown J, Tickle C, Duboule D. Hox genes and the morphogenesis of the vertebrate limb. *Prog Clin Biol Res* 1993;383A:11-20.
- (104) Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007 Jun 29;129(7):1311-1323.
- (105) Zeisig BB, Milne T, Garcia-Cuellar MP, Schreiner S, Martin ME, Fuchs U, et al. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* 2004 Jan;24(2):617-628.
- (106) Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet* 2013 Dec;14(12):880-893.
- (107) Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 2012 02/16;482(7385):339-346.
- (108) Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2013 Mar;20(3):300-307.
- (109) Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010 04/15;464(7291):1071-U148.
- (110) Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 1997 Jan;17(1):495-505.
- (111) Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, et al. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 2009 Apr 2;113(14):3314-3322.

- (112) Taghon T, Stolz F, De Smedt M, Cnockaert M, Verhasselt B, Plum J, et al. HOX-A10 regulates hematopoietic lineage commitment: evidence for a monocyte-specific transcription factor. *Blood* 2002 Feb 15;99(4):1197-1204.
- (113) Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 2007 05/01;109(9):3687-3696.
- (114) Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 1997 01;17(1):495-505.
- (115) Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 1998 Jul 1;17(13):3714-3725.
- (116) Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995 Feb 24;80(4):529-532.
- (117) Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996 Oct 4;87(1):13-20.
- (118) Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar 27;1470(2):M55-62.
- (119) Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and I kappa B function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 1999 Nov 22;18(49):6888-6895.
- (120) Wang D, Baldwin AS, Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 1998 Nov 6;273(45):29411-29416.
- (121) Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell* 2011 Nov 18;44(4):667-678.
- (122) Niranjana Kumari S, Lasda E, Brazas R, Garcia-Blanco MA. Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods* 2002 Feb;26(2):182-190.
- (123) Darnell R. CLIP (cross-linking and immunoprecipitation) identification of RNAs bound by a specific protein. *Cold Spring Harb Protoc* 2012 Nov 1;2012(11):1146-1160.
- (124) Stein CA, Hansen JB, Lai J, Wu S, Voskresenskiy A, Hog A, et al. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res* 2010 Jan;38(1):e3.

- (125) Arun G, Diermeier S, Akerman M, Chang KC, Wilkinson JE, Hearn S, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev* 2016 Jan 1;30(1):34-51.
- (126) Liu PY, Erriquez D, Marshall GM, Tee AE, Polly P, Wong M, et al. Effects of a novel long noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc expression and neuroblastoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2014 Jun 6;106(7):10.1093/jnci/dju113. Print 2014 Jul.
- (127) Wong E, Goldberg T. Mipomersen (kynamro): a novel antisense oligonucleotide inhibitor for the management of homozygous familial hypercholesterolemia. *P T* 2014 Feb;39(2):119-122.
- (128) Aartsma-Rus A, Krieg AM. FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther* 2017 Feb;27(1):1-3.
- (129) van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, et al. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther* 2016 Jan;43(1):102-113.

Thesen

1. Die lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) *HOXA10-AS* wird in hämatopoetischen Stammzellen hoch exprimiert und während der weiteren Differenzierung herunterreguliert.
2. Die ektope Überexpression von *HOXA10-AS* beeinträchtigt die physiologische monozytäre Differenzierung.
3. *HOXA10-AS* wird in *KMT2A-r* AML deutlich höher exprimiert als in anderen zytogenetischen pädiatrischen AML-Subgruppen.
4. Durch eine lentivirale *HOXA10-AS* Überexpression wird die leukämische Proliferation von *KMT2A-r* AML Blasten gesteigert.
5. Die Herunterregulation von *HOXA10-AS* mittels shRNAs, CRISPR/Cas9 oder LNA-GapmeRs reduziert die Proliferation von *KMT2A-r* AML Zellen.
6. *HOXA10-AS* ist innerhalb der Zelle hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert.
7. Alterationen der *HOXA10-AS* Expression haben keinen Einfluss auf die Nachbargene *HOXA10* und miR-196b.
8. *HOXA10-AS* führt mechanistisch zur Aktivierung des NF- κ B Signalwegs.
9. Eine shRNA-vermittelte Herunterregulierung von *HOXA10-AS* führt zur verminderten Proliferation von humanen Patientenblasten im Mausmodell.
10. Die lncRNA *HOXA10-AS* übt insgesamt eine onkogene Rolle in der Aufrechterhaltung von *KMT2A-r* AML aus und stellt eine potentielle Zielstruktur für neue Therapieansätze dar.

The stem cell–specific long noncoding RNA HOXA10-AS in the pathogenesis of KMT2A-rearranged leukemia

Sina Al-Kersh, ^{1,*} Raj Bhayadia, ^{2,*} Michelle Ng, ^{2,*} Lonneke Verboon, ² Stephan Emmrich, ³ Lucie Gack, ² Adrian Schwarzer, ⁴ Till Strowig, ⁵ Dirk Heckl, ^{2,†} and Jan-Henning Klusmann ^{2,†}

¹Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ²Pediatric Hematology and Oncology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle, Germany; ³Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY; ⁴Department of Hematology, Oncology, Hemostaseology and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and ⁵Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

Key Points

- The lncRNA HOXA10-AS is highly expressed in KMT2A-rearranged AMLs and exerts its oncogenic effects by inducing NF-κB target genes.
- Knockdown of HOXA10-AS reduces the leukemic growth of KMT2A-rearranged AML blasts *in vivo*.

HOX genes are highly conserved, and their precisely controlled expression is crucial for normal hematopoiesis. Accordingly, deregulation of HOX genes can cause leukemia. However, despite of intensive research on the coding HOX genes, the role of the numerous long noncoding RNAs (lncRNAs) within the HOX clusters during hematopoiesis and their contribution to leukemogenesis are incompletely understood. Here, we show that the lncRNA HOXA10-AS, located antisense to HOXA10 and mir-196b in the HOXA cluster, is highly expressed in hematopoietic stem cells (HSCs) as well as in KMT2A-rearranged and NPM1 mutated acute myeloid leukemias (AMLs). Using short hairpin RNA- and locked nucleic acid-conjugated chimeric antisense oligonucleotide (LNA-GapmeR)-mediated HOXA10-AS-knockdown and CRISPR/Cas9-mediated excision *in vitro*, we demonstrate that HOXA10-AS acts as an oncogene in KMT2A-rearranged AML. Moreover, HOXA10-AS knockdown severely impairs the leukemic growth of KMT2A-rearranged patient-derived xenografts *in vivo*, while high HOXA10-AS expression can serve as a marker of poor prognosis in AML patients. Lentiviral expression of HOXA10-AS blocks normal monocytic differentiation of human CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. Mechanistically, we show that HOXA10-AS localizes in the cytoplasm and acts *in trans* to induce NF-κB target genes. In total, our data imply that the normally HSC-specific HOXA10-AS is an oncogenic lncRNA in KMT2A-r AML. Thus, it may also represent a potential therapeutic target in KMT2A-rearranged AML.

Introduction

The discovery of noncoding RNAs as important regulators of cell biology, differentiation, and disease pathogenesis has led to a paradigm shift in molecular biology. In fact, it has been proposed that the complexity of mammalian development results from the diversity of noncoding RNA expression rather than from protein-coding genes.¹ Long noncoding RNAs (lncRNAs), defined as noncoding transcripts > 200 nt,² have on average a more tissue-specific and developmental stage-specific expression pattern than protein-coding genes, suggesting a crucial role in pathophysiological processes.^{3,4} However, only a small fraction of lncRNAs have been functionally characterized, and even fewer have been studied in the context of hematopoiesis and leukemogenesis.

Submitted 22 January 2019; accepted 18 November 2019. DOI 10.1182/bloodadvances.2019032029.

*S.A.-K., R.B., and M.N. contributed equally to this study.

†D.H. and J.-H.K. contributed equally to this study.

Microarray data are available in the Gene Expression Omnibus under the accession number GSE123694 (reviewer access token: sfgzyueybnffox).

For original data, please contact jan-henning.klusmann@uk-halle.de or dirk.heckl@uk-halle.de.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2019 by The American Society of Hematology

The most frequent structural cytogenetic aberration in pediatric acute myeloid leukemia (AML) is *KMT2A* (formerly known as mixed lineage leukemia [*MLL*]) rearrangement (*KMT2A-r*), which is present in ~20% of all patients with childhood AML⁵ and is strongly associated with a monocytic/monoblastic phenotype.⁶ Among the various forms of *KMT2A-r*, a common theme is that *KMT2A* fusion proteins aberrantly upregulate the expression of *HOX* genes, which are normally modulated by wild-type *KMT2A*.^{7,8} *HOX* genes play an essential role in the regulation of hematopoiesis through lineage- and differentiation stage-specific expression. They are highly expressed in hematopoietic stem cells (HSCs) and early progenitors and are downregulated during differentiation.⁹ Ectopic expression of several *HOX* genes was shown to be sufficient for the initiation of leukemic transformation. Accordingly, in *KMT2A-r* AMLs, the fusion protein-mediated overexpression of *HOX* genes is at least partially responsible for leukemic transformation.¹⁰ Notably, numerous lncRNAs are located within the *HOX* clusters. Many are highly conserved and differentially expressed during development, suggesting their biological importance.¹¹ Although a handful of *HOX* lncRNAs, such as *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, and *HOTTIP*, have been characterized,¹¹⁻¹³ the contribution of other *HOX* cluster lncRNAs to the pathogenesis of AML remains unknown.

Our study focused on characterizing *HOXA10-AS* and its role during hematopoiesis and leukemogenesis. *HOXA10-AS* is a lncRNA situated in the 3' region of the *HOXA* cluster and transcribed antisense to *HOXA10* and the intronic mir-196b, both of which are highly expressed in *KMT2A-r* AMLs and play crucial roles during leukemogenesis.¹⁴⁻¹⁸

Using short hairpin RNA (shRNA)- and locked nucleic acid-conjugated chimeric antisense oligonucleotide (LNA-GapmeR)-mediated knockdown and CRISPR/Cas9-mediated excision, we demonstrate that *KMT2A-r* AML cell lines and patient derived-xenografts are dependent on high *HOXA10-AS* expression, an effect that was independent of changes in nearby *HOXA* coding gene expression. We further demonstrate that *HOXA10-AS* is HSC specific and that its overexpression blocks normal monocytic differentiation and enhances leukemic growth by inducing NF- κ B target genes. Thus, our data implicate *HOXA10-AS* as an oncogenic lncRNA and a potential therapeutic target.

Materials and methods

For detailed descriptions, see supplemental Methods.

Patient samples

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) were isolated by labeling CD34⁺ cells with magnetic cell-sorting beads (Miltenyi Biotech), according to the manufacturer's instructions. AML patient samples were provided by the AML Berlin-Frankfurt-Münster Study Group (AML-BFM-SG, Essen, Germany). Informed consent was obtained from all human participants or custodians. All investigations were approved by the local ethics committees of the Hannover Medical School and the Martin Luther University Halle-Wittenberg and performed in accordance with the declaration of Helsinki and local laws and regulations.

Lentiviral vector construction and transduction

shRNAs against *HOXA10-AS* were designed, cloned into a pLKO5d.SFFV.eGFP.mir30N backbone, and tested with a reporter

assay as previously described.¹⁹ For shRNA reporter assays, gBlocks (Integrated DNA Technologies) with shRNA-binding sites were inserted into pTtNPT and used to generate stable reporter cell lines, which were then transduced with shRNA constructs to perform the reporter assay.²⁰ Pairs of single guide RNAs (sgRNAs) targeting the promoter and transcription start site of *HOXA10-AS* or *firefly luciferase* (nontargeting control) were cloned into the lentiviral dual-sgRNA SGL40C.EFS.GFP vector, as previously described.^{21,22} The design of the LBid-lnc vector for the ectopic expression of lncRNAs has been previously described.²³ Transduction, culture, and sorting of AML blasts and CD34⁺ HSPCs were performed as previously described.^{24,25}

LNA-GapmeRs

LNA-GapmeRs against *HOXA10-AS* were designed and provided by Exiqon. Negative control B was used as a nontargeting control (Exiqon). Cell lines were analyzed after the addition of 2.5 μ M LNA-GapmeRs to the culture medium (unassisted uptake).²⁶

Flow cytometry and cell sorting

Flow cytometry analyses of the transduced HSPCs, cell lines, and patient blasts were performed on a fluorescence-activated cell sorter (FACS) Canto flow cytometer (BD Biosciences) or a CytOFLEX B5-R3-V5 (Beckman Coulter). Sorting was performed on a FACSAria II (SORP) or FACSAria Fusion (BD Biosciences). Kaluza 1.3/1.5 (Beckman Coulter) was used for data analysis. Staining and measurement were performed according to standard protocols as previously described for human cells²⁷ using the antibodies CD163-PE (BD Biosciences), CD11b-PeCy7 (Beckman Coulter), CD14-APC (Beckman Coulter), CD45-V500 (BD Biosciences), CD163-APC-Cy7 (BioLegend), CD45-APC (BD Biosciences), CD15-BV605 (BD Biosciences), and CD66b-PE (BD Biosciences). Cell cycle analysis and apoptosis analysis were performed using the BrdU Flow Kit (BD Biosciences) and the Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences), respectively, according to the manufacturer's instructions. Single-cell clones were derived by directly sorting transduced cells into 96-well plates.

Mice and transplantation experiments

Primary human AML cells were CD3 depleted using OKT3 (BioXCell) and used after serial transplantation into xenograft mouse models as previously described.²⁵ For shRNA-mediated knockdown of *HOXA10-AS*, AML cells were isolated, lentivirally transduced, and transplanted into 2.5-Gy-irradiated NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj}/SzJ recipients. All animal experiments protocols were approved by the state authorities.

Gene expression data collection and analysis

Gene expression analyses were performed by the core facility of the Helmholtz Center for Infection Research in Braunschweig, Germany, using the Gene-Expression Affymetrix Microarray Clariom S Pico Assay as the array platform. The data were preprocessed and analyzed using R and Bioconductor as previously described.¹⁹

Statistical analyses and definitions

Complete remission was defined as fulfillment of the Cancer and Leukemia Group B criteria,²⁹ and early death was defined as death before or within the first 6 weeks of treatment. Event-free survival (EFS) was defined as time from diagnosis to the first event or last

follow-up. Events were death from any cause, failure to achieve remission, relapse, and secondary malignancy. Failure to achieve remission was considered as an event on day 0. Overall survival was defined as the time between diagnosis and death from any cause or last follow-up. The Kaplan-Meier method was used to estimate survival rates.²⁹ Differences were compared using the 2-sided log-rank test,³⁰ and standard errors were obtained using the Greenwood formula. The DESeq2 package was used to normalize and variance-stabilize RNA-sequencing read count data.³¹ The pediatric AML data set further required batch correction, for which we used the *sva* package.³² Normalized (and batch-corrected) expression of *HOXA10-AS* was taken as a continuous variable in the survival model. For patient stratification, the optimal cutoff point was determined using maximally selected log-rank statistics as implemented in the *maxstat* R package (<http://cran.r-project.org/web/packages/maxstat/index.html>). The calculated cutoff for EFS was used for both overall survival and EFS analyses. We relied on R Version 3.3 (<http://www.r-project.org/>) for all of the above computations.

Statistical evaluations of experimental data were carried out using 2-way analysis of variance or Student *t* test for multiple comparisons. The level of significance was set at $P < .05$. All data are presented as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) as indicated. Calculations were performed using GraphPad Prism 6/7 (STATCON).

Results

HOXA10-AS is highly expressed in HSCs and *KMT2A-r* AML blasts

The lncRNA gene *HOXA10-AS* is located on human chromosome 7 antisense to the *HOXA* protein-coding genes (Figure 1A). The 3' end of *HOXA10-AS* overlaps the 3' end of *HOXA10*. The entire miR-196b gene is antisense and overlapping to *HOXA10-AS*. Our microarray-based lncRNA expression atlas of the hematopoietic system¹⁹ revealed that the lncRNA *HOXA10-AS* is highly and specifically expressed in HSCs and downregulated during differentiation (data not shown), which was verified via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR; Figure 1B). As previously described,^{9,17} *HOXA10* and miR-196b were also highly expressed in HSCs, but in contrast to *HOXA10-AS*, their expression remained high in hematopoietic progenitor populations (Figure 1C). To expand our insights into *HOXA10-AS* expression patterns in leukemia, we performed qRT-PCR on AML cell lines, revealing significantly higher *HOXA10-AS* levels in *KMT2A-r* (t[4;11]: MV4-11; t[9;11]: NOMO-1, THP-1; t[6;11]: SHI-1, ML-2; ins[11;9]: MOLM-13; partial tandem duplication: EOL-1) compared with non-*KMT2A-r* leukemia cell lines (37-fold; $P = .0085$; Figure 1D). Notably, no difference of *HOXA10* and miR-196b expression was observed between *KMT2A-r* and non-*KMT2A-r* cell lines (*HOXA10*: $P = .776$; miR-196b: $P = .0645$; Figure 1E). Deeper analysis of our microarray expression atlas data¹⁹ affirmed high *HOXA10-AS* expression also in primary AMLs with *KMT2A-r* compared with cases with other cytogenetic aberrations. *HOXA10-AS* expression was significantly higher in *KMT2A-r* AMLs with t(9;11) than in AMLs with t(8;21) ($P = .0101$) and t(15;17) ($P = .0109$) (Figure 1F).

Thus, *HOXA10-AS* is an HSC-specific lncRNA that is highly expressed in *KMT2A-r* AMLs.

HOXA10-AS is required for maintenance of *KMT2A-r* rearranged AMLs

The specific upregulation of *HOXA10-AS* in *KMT2A-r* AMLs prompted us to hypothesize that this lncRNA may exert context-dependent oncogenic effects. Aiming to functionally verify our hypothesis, we performed loss-of-function experiments using shRNAs, LNA-GapmeRs, and CRISPR/Cas9-mediated excision. *HOXA10-AS* downregulation using 3 different shRNAs reduced the growth of 3 *KMT2A-r* cell lines with high endogenous *HOXA10-AS* expression (EOL-1, MOLM-13, and MV4-11) compared with the nonsilencing shRNA control (against Renilla luciferase; Figure 2A). The growth defect induced by *HOXA10-AS* knockdown in *KMT2A-r* cells was verified using LNA-GapmeRs that enable strand-specific silencing of RNA transcripts (Figure 2B; supplemental Figure 1). In the EOL-1 cell line, which shows high endogenous *HOXA10-AS* expression, shRNA-mediated downregulation caused a reduction of S-phase cells accompanied by an accumulation of G1-phase cells and an increase in Annexin V⁺ apoptotic cells (Figure 2C-D). In contrast, a non-*KMT2A-r* cell line with low *HOXA10-AS* expression (NB-4) was insensitive to *HOXA10-AS* knockdown (Figure 2A-D).

To further validate these findings, we excised the promoter and transcription start site of *HOXA10-AS* using 4 pairs of sgRNA, in a dual-sgRNA lentiviral vector²² per pair (Figure 2E). Transduction of these sgRNA vectors into Cas9-expressing EOL-1, MOLM-13, MV4-11, and NB-4 cell lines and subsequent growth assays confirmed that the loss of *HOXA10-AS* impairs the proliferative potential of *KMT2A-r* cells (Figure 2F). Even though the reduction of cells in S-phase was not significant, we observed, similar to the knockdown experiments, an induction of apoptosis in EOL-1 cells, but not in NB-4 cells (Figure 2G-H).

Our data indicate that *HOXA10-AS* is essential for the maintenance of *KMT2A-r* AMLs, which are dependent on high levels of this transcript.

Overexpression of *HOXA10-AS* promotes leukemic growth and perturbs monocytic differentiation

To evaluate the oncogenic consequences of high *HOXA10-AS* levels, we lentivirally expressed *HOXA10-AS* in ML-2 cells and *KMT2A-r* patient blasts (supplemental Table 1 and supplemental Figure 2A), both of which are *KMT2A-r* and show a moderate endogenous *HOXA10-AS* expression. We leveraged a bidirectional vector system that was particularly developed for the expression of lncRNAs without adjacent viral sequences and features a poly(A) signal downstream of the lncRNA cassette.²³ Subsequent proliferation assays revealed that overexpression of *HOXA10-AS* significantly increased the growth of ML-2 cells and *KMT2A-r* patient blasts compared with the cells transduced with the empty vector control (Figure 3A-B).

The high expression of *HOXA10-AS* in HSCs further suggests an important regulatory role for this lncRNA during hematopoietic differentiation. To investigate this role, we lentivirally expressed *HOXA10-AS* in CD34⁺ HSPCs (supplemental Figure 2A-B). *HOXA10-AS* overexpression significantly impaired differentiation under monocytic culture conditions (Figure 3C-D). Flow cytometry on day 11 of differentiation showed a reduction of CD11b⁺/CD14⁺ (1.7-fold reduction; $P = .0039$) and CD14⁺/CD163⁺ monocytic cells (2.1-fold reduction; $P = .0001$), compared with the empty vector control (Figure 3C). This differentiation block was verified

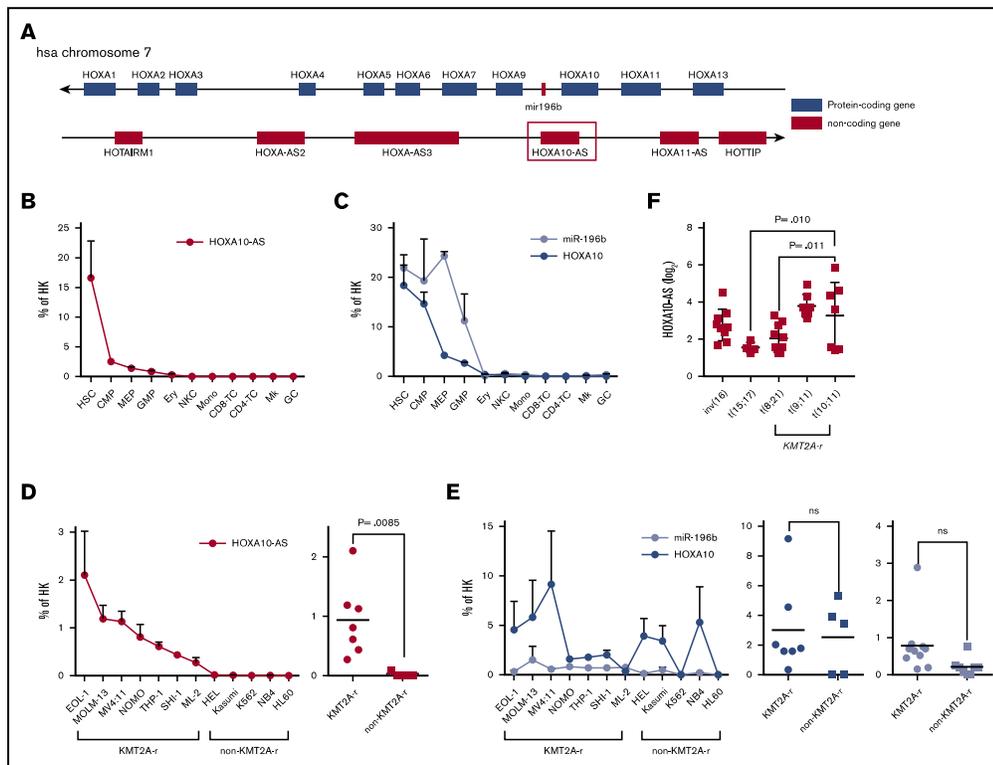


Figure 1. *HOXA10-AS* is highly expressed in HSPCs and *KMT2A*-rearranged leukemic cells. (A) Schematic of the genomic locus around *HOXA10-AS*, which is antisense to *HOXA10* and miR-196b. (B-C) Mean expression of *HOXA10-AS* (B) and *HOXA10* and miR-196b (C) in defined blood cell populations from healthy individuals as a percentage of the housekeeping (*HK*) gene β -2 microglobulin or *RNU48* and *U6* as measured by qRT-PCR ($n \geq 2$; presented as mean \pm SEM). HSCs, common myeloid progenitor cells (CMP), granulocyte-monocyte progenitor cells (GMP), megakaryocyte-erythroid progenitor cells (MEP), megakaryocytes (Mk), erythroid precursors (Ery), granulocytes (GC), monocytes (Mono), CD4 and CD8 T cells, and natural killer cells (NKC). (D-E) Mean expression of *HOXA10-AS* (D) and *HOXA10* and miR-196b (E) in AML cell lines as a percentage of the housekeeping genes β -2 microglobulin or *RNU48* and *U6* as measured by qRT-PCR ($n \geq 2$; presented as mean \pm SEM). On the right, *HOXA10-AS*, *HOXA10*, and miR-196b expression in *KMT2A*-rearranged and non-*KMT2A*-rearranged cell lines (unpaired Student *t* test). (F) Normalized expression of *HOXA10-AS* in cytogenetically defined pediatric patient cohorts (1-way variance analysis). ns, not significant.

morphologically; *HOXA10-AS*-expressing cells were smaller, with condensed nuclei and less cytoplasm, making them resemble immature monocytic progenitors compared with the typical monocytes observed in the control (Figure 3D). Corroborating these findings, colony-forming unit (CFU) assays showed a reduction of granulocytic and monocytic (CFU-G/M) CFUs in *HOXA10-AS*-expressing cells compared with the control (2-fold reduction; $P < .0001$; Figure 3E). Similar effects on differentiation were observed in conditions supporting granulocytic differentiation (supplementary Figure 2C-D).

***HOXA10-AS* does not act as a local regulator of nearby genes**

Next, we sought to understand how *HOXA10-AS* exerts its oncogenic effects on a molecular level. Many lncRNAs have been shown to act as local regulators influencing the expression of

nearby genes.³³ Therefore, we first evaluated the effect of *HOXA10-AS* perturbation on antisense *HOX* genes and miR-196b. shRNA-mediated knockdown of *HOXA10-AS* did not significantly alter the expression of *HOXA10*, *HOXA9*, and miR-196b in the EOL-1 cells (Figure 4A), which were most sensitive to *HOXA10-AS* knockdown (Figure 2A). Inconsistent changes in *HOXA9* expression were observed in MOLM-13 and MV4-11 *KMT2A-r* cells (Figure 4A), which were also sensitive to *HOXA10-AS* knockdown (Figure 2A). No changes were observed in NB-4 cells, which have low endogenous *HOXA10-AS* expression (Figure 4A).

To further study the effect of *HOXA10-AS* on nearby genes, we excised the promoter and transcription start site of *HOXA10-AS* using the CRISPR/Cas9 system (Figure 2D) and derived single-cell clones of the MOLM-13, MV4-11, and NB-4 cell lines. No single-cell

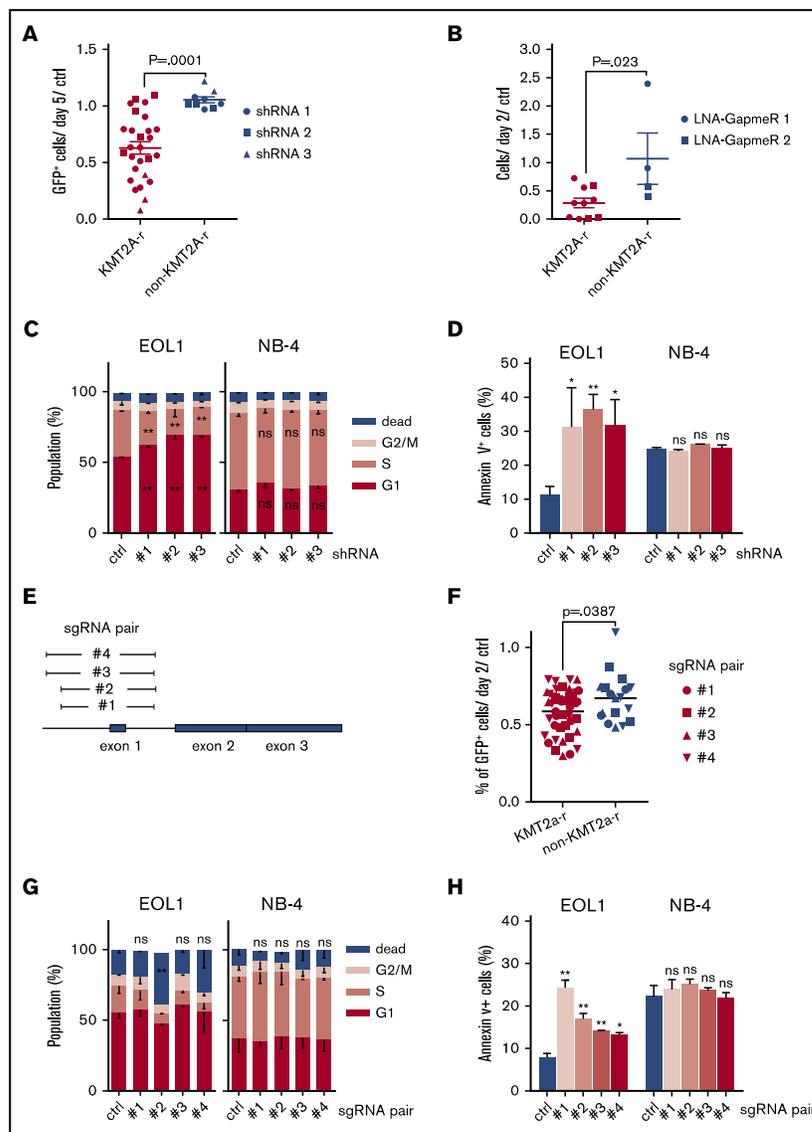


Figure 2. *HOXA10-AS* is required for the maintenance of *KMT2A*-rearranged AML cells. (A) Percentage of cells transduced with shRNAs against *HOXA10-AS* after 21 days in culture compared with day 5 and a nontargeting shRNA (ctrl; n = 3; unpaired Student *t* test; presented as mean ± SEM). (B) Cell counts on day 21 following treatment with LNA-GapmeRs against *HOXA10-AS* compared with day 2 and the nontargeting control (ctrl; n = 2; unpaired Student *t* test; presented as mean ± SEM). (A-B) EOL1, MOLM-13, and MV4-11 were used as *KMT2A-r* cell lines, while NB-4 was used as the non-*KMT2A-r* cell line. (C-D) 5-Bromo-2'-deoxyuridine cell cycle (C) and Annexin V apoptosis (D) assays in EOL1 and NB-4 cells after shRNA-mediated *HOXA10-AS* knockdown using 3 different shRNAs. The percentage of cells is shown as mean ± SD (n = 2; **P* < .05; ***P* < .01). (E) Schematic of the genomic locus and of the regions that are excised by the sgRNA pairs. (F) Percentage of cells transduced with *HOXA10-AS* excision sgRNAs (GFP⁺) after 21 days in culture compared with day 2 and nontargeting sgRNAs (n ≥ 3; unpaired Student *t* test; presented as grand mean).

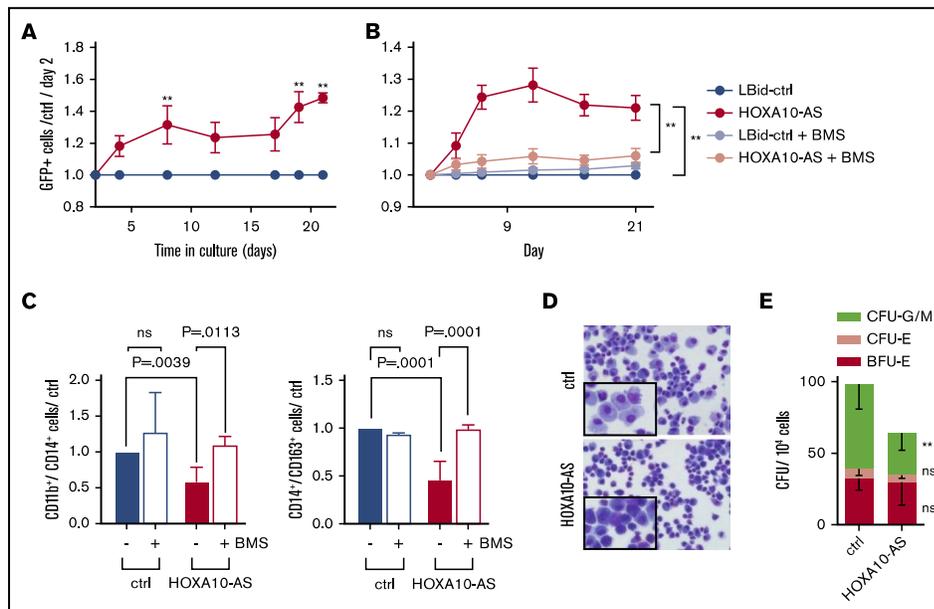


Figure 3. Overexpression of *HOXA10-AS* promotes leukemic growth and perturbs differentiation. (A) Percentage of LBid-*HOXA10-AS*-transduced GFP⁺ patient-derived blasts normalized to day 2 and to LBid-ctrl-transduced cells (n = 3; 2-way variance analysis; presented as mean ± SD; **P < .01). (B) Percentage of LBid-*HOXA10-AS*-transduced GFP⁺ ML-2 cells normalized to day 2 and to LBid-control-transduced cells in the presence of 1 μM BMS-345541 or dimethyl sulfoxide (n = 3; 2-way variance analysis; presented as mean ± SD; **P < .01). (C) FACS analysis of CD11b⁺/CD14⁺ and CD14⁺/CD163⁺ cells on day 11 of in vitro monocytic differentiation in the presence or absence of 1 μM BMS-345541 (n = 3-9; 2-way variance analysis; presented as mean ± SD). (D) May-Grünwald-Giemsa staining on day 10 of monocytic differentiation (original magnification ×400). (E) Number of CFUs in methylcellulose-based colony-forming assays (n = 4; 2-way variance analysis; presented as mean ± SD; **P < .01).

clones could be derived from EOL-1 (data not shown). Excision of the intended region was verified by Sanger sequencing (supplemental Figure 3). Again, the expression of *HOXA10* and *HOXA9* was not significantly altered in the single-cell-derived clones (Figure 4B). In contrast to the results we obtained with shRNAs, variable depletion of miR-196b was observed in MOLM-13 and MV4-11 *HOXA10-AS* excision cells (Figure 4B), which may be due to regulatory elements of miR-196b being excised along with the *HOXA10-AS* promoter. These data argue against the possibility that the effects of *HOXA10-AS* repression or loss are mediated by the control of the antisense *HOX* genes or miR-196b. This conclusion is further supported by the notion that *HOXA10-AS* is primarily located in the cytoplasm, as shown by RNA isolation from the individual compartments and subsequent qRT-PCR (Figure 4C).

***HOXA10-AS* exerts its effects by inducing NF-κB target genes**

The cytoplasmic enrichment of the transcript and the inability to proof a local regulatory function led us to suppose that *HOXA10-AS*

acts in *trans*. To further understand the molecular consequences of high *HOXA10-AS* expression, we assessed early transcriptional changes that lead to the monocytic differentiation arrest caused by ectopic *HOXA10-AS* expression. We performed a microarray-based gene expression analysis on FACS-sorted myeloid precursors (CD11b⁺/CD14⁻/CD117⁻; supplemental Figure 4) after 5 days of monocytic culture. We identified 42 genes that were differentially expressed in *HOXA10-AS*-overexpressing cells (40 upregulated and 2 downregulated; false discovery rate <0.05; supplemental Table S2). Notably, *HOXA9* and *HOXA10* were not among the differentially expressed genes (supplemental Figure 5B). Gene Ontology analysis revealed the significantly upregulated genes to be enriched for factors involved in immune response, cytokine signaling, and hematopoietic cell lineage specifications (supplemental Figure 5A). Accordingly, gene set enrichment analysis identified NF-κB targets as the most highly enriched gene set (Figure 4D).

To further validate NF-κB as a downstream component of the *HOXA10-AS* mechanism, we analyzed phosphorylation of the

Figure 2. (continued) EOL-1, MOLM-13 and MV4-11 were used as *KMT2A-r* cell lines, while NB-4 was used as the non-*KMT2A-r* cell line. (G-H) 5-Bromo-2'-deoxyuridine cell cycle (G) and Annexin V apoptosis (H) assays in EOL-1 and NB-4 cells after sgRNA-mediated excision using 4 different sgRNA pairs. The percentage of cells is shown as mean ± SD (n = 2; *P < .05; **P < .01).

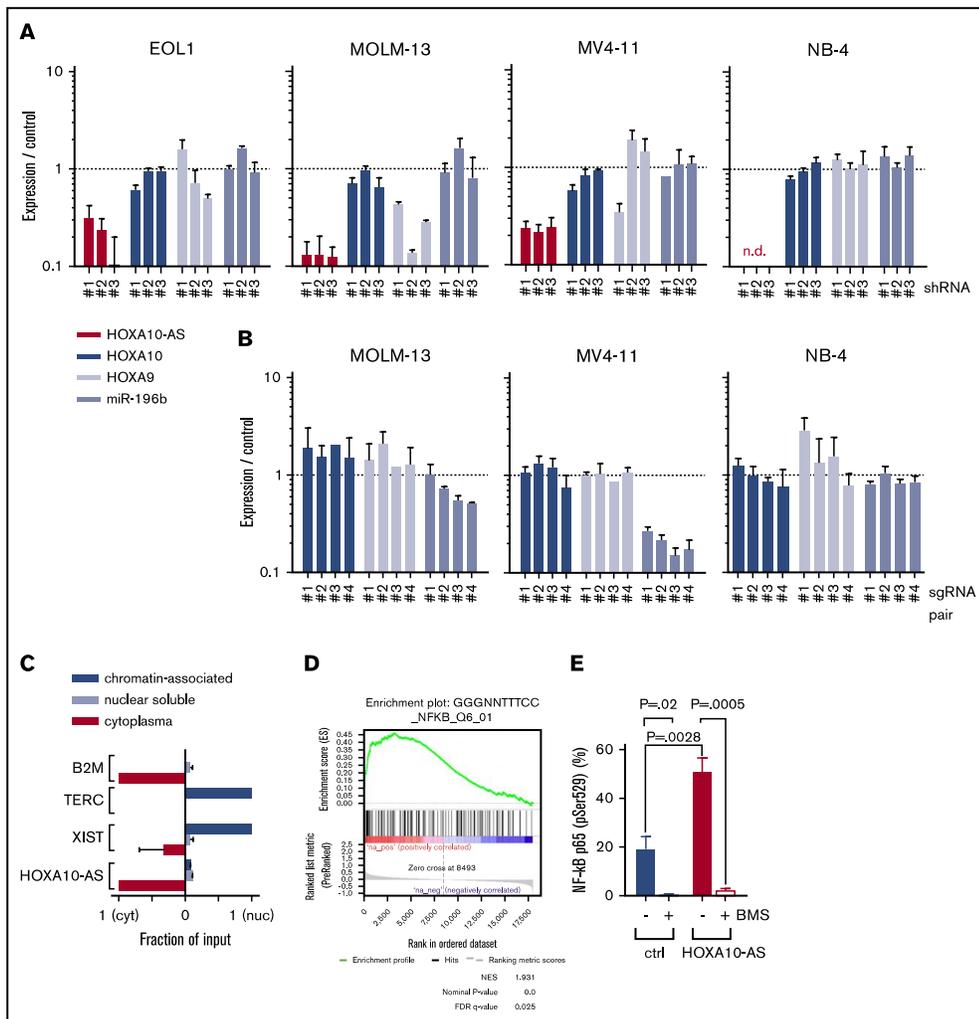


Figure 4. *HOXA10-AS* does not act as a local regulator of nearby genes and exerts its effects by inducing NF- κ B target genes. (A) Expression of *HOXA10-AS*, *HOXA10*, *HOXA9*, and *miR-196b* as measured by qRT-PCR in EOL-1 cells, MOLM-13, MV4-11, and NB-4 cells after shRNA-mediated *HOXA10-AS* knockdown using 3 different shRNAs ($n \geq 2$; n.d., not detectable). (B) Expression of *HOXA10*, *HOXA9*, and *miR-196b* as measured by qRT-PCR in single-cell clones of MOLM-13, MV4-11, and NB-4 cells after sgRNA-mediated *HOXA10-AS* excision using 4 different pairs of sgRNAs ($n = 2$). (C) Enrichment of *HOXA10-AS* in the cytoplasmic, nuclear soluble, and chromatin-bound compartments as measured by qRT-PCR on fractionated RNA from MOLM-13 and EOL-1 cells. The enrichment is shown as a ratio normalized to the compartment in which the transcript is most highly expressed ($n = 2$). (D) Gene set enrichment analysis results for NF- κ B target genes in LBid-*HOXA10-AS*-transduced, sorted CD11b⁺/CD14⁻/CD117⁻ cells compared with LBid-control-transduced cells on day 5 of monocytic differentiation. (E) Percentage of phosphorylated p65-positive (pSer529) LBid-*HOXA10-AS*- or LBid-control-transduced ML-2 cells in the presence or absence of 1 μ M BMS-345541 ($n = 2$; presented as mean \pm SD). FDR, false discovery rate; NES, normalized enrichment score.

NF- κ B subunit p65 at serine 529, which is a marker for NF- κ B activation.³⁴ In ML-2 cells, *HOXA10-AS* overexpression led to elevated p65 phosphorylation, indicating increased NF- κ B activation (Figure 4E). Moreover, inhibition of the NF- κ B pathway in ML-2

cells using the I κ B kinase inhibitor BMS-345541 abolished the *HOXA10-AS*-induced growth advantage (Figure 3B) and rescued the monocytic differentiation block in *HOXA10-AS*-transduced HSPCs (Figure 3C).

Taken together, our experiments suggest a model wherein *HOXA10-AS* induces NF- κ B target genes in myeloid precursors, thereby perturbing monocytic differentiation in HSPCs and promoting leukemic growth in *KMT2A-r* blasts.

***HOXA10-AS* is a prognostic factor in AML**

Our data indicate that *HOXA10-AS* is an oncogenic lncRNA and that *HOXA10-AS* expression is essential for the maintenance of *KMT2A-r* AMLs. Therefore, we aimed to investigate the impact of *HOXA10-AS* expression on AML prognosis. To accomplish this, we stratified a cohort of 258 pediatric patients³⁵ and a cohort of 171 adult AML patients³⁶ based on *HOXA10-AS* expression (Figure 5A-D). In both cohorts, *HOXA10-AS* was mostly absent from cases with t(15;17), t(18;21) and inv(16) and also from cases with *CEBPA* mutations (Figure 5A-D), while it was highly expressed in cases with *KMT2A-r*, in accordance with our previous results (Figure 1D). In addition, we observed high expression levels in adult cases with normal karyotype and *NPM1* mutations (Figure 5C-D), suggesting a correlation between *HOXA10-AS* expression and the underlying genetic background of these AMLs. Kaplan-Meier analysis using an optimal *HOXA10-AS* expression cutoff determined via maximally selected rank statistics adjusted for multiple testing^{37,38} (supplemental Figure 6A-B) demonstrated that high *HOXA10-AS* expression was significantly associated with lower EFS in pediatric (26.6% vs 49.3% after 5 years; $P_{\text{adj,log-rank}} = .0015$; Figure 5E) and adult (14.0% vs 48.7% after 5 years; $P_{\text{adj,log-rank}} < .0001$; Figure 5F) patients. Overall survival was similarly reduced in both the pediatric (50.6% vs 65.8% after 5 years; $P_{\text{adj,log-rank}} = .04$; supplemental Figure 6C) and adult (15.4% vs 51.4% after 5 years; $P_{\text{adj,log-rank}} < .0001$; supplemental Figure 6D) cohorts, thus identifying *HOXA10-AS* as a prognostic factor. However, the association of *HOXA10-AS* expression with certain genetic AML subtypes that are known to have high *HOXA9* or *HOXA10* expression disqualifies *HOXA10-AS* from being an independent prognostic factor. Nonetheless, in cases where cytogenetic analyses are not possible or where *HOXA9* and *HOXA10* expression analysis is inconclusive, quantifying *HOXA10-AS* expression may add prognostic value. These results moreover suggest that targeting *HOXA10-AS* may be a promising therapeutic approach for AML patients who present with high levels of *HOXA10-AS* expression.

***HOXA10-AS* downregulation impairs leukemic growth in vivo**

To test the potential therapeutic value of targeting *HOXA10-AS* in AML with high levels of *HOXA10-AS* expression, we performed knockdown experiments in vivo. shRNAs against *HOXA10-AS* (GFP⁺) and a luciferase control (dTomato⁺) were transduced into a tertiary *KMT2A-r* patient-derived AML xenograft (supplemental Table S1). The transduced cells were mixed in a 1:1 ratio and transplanted into sublethally irradiated quaternary recipient mice for an in vivo competition assay (Figure 6A; supplemental Figure 7). At the end point of the experiment, AML blasts containing the shRNA against *HOXA10-AS* were significantly diminished in the bone marrow (end point to input ratio of 0.1 [GFP⁺] vs 3.0 [dTomato⁺]; $P = .0001$), spleen (0.17 vs 2.45; $P = .0001$), and liver (0.21 vs 2.70; $P = .0001$) compared with the control (Figure 6B; supplemental Figure 7). These results further underline the dependency of *KMT2A-r* AMLs on *HOXA10-AS* and highlight its potential use as therapeutic target.

Discussion

Since the discovery of numerous highly conserved intergenic and antisense lncRNAs within the *HOX* clusters, it has been postulated that *HOX* lncRNAs exert significant control over the proper spatial and temporal expression of *HOX* genes.^{39,40} The precise expression of *HOX* genes is essential for normal development, and their deregulation is causal for various diseases, including leukemia. Here, we introduce *HOXA10-AS* as a *HOX* lncRNA that is highly expressed in HSCs and *KMT2A-r* leukemias. We show that it regulates normal myeloid differentiation and contributes to the pathogenesis of *KMT2A-r* leukemias by inducing NF- κ B target genes. Moreover, we established *HOXA10-AS* expression as a prognostic marker (although not independent) in both pediatric and adult AML, where it can be used to group patients according to their underlying genetic background and risk level. Lastly, we provide a proof of concept for potential therapeutic targeting of *HOXA10-AS*.

Since *KMT2A* rearrangement is the most frequent structural cytogenetic aberration in children with AML, *KMT2A-r* leukemias are a highly relevant subtype for scientific and clinical research. lncRNAs present a new opportunity to understand, classify, and treat these AMLs, and in keeping with this theme, we found *HOXA10-AS* to be significantly involved in the maintenance of *KMT2A-r* leukemia. We provide several lines of evidence using complementary gain- and loss-of-function approaches in different in vitro and in vivo systems to support *HOXA10-AS* as an essential lncRNA in *KMT2A-r* AMLs. In primary *KMT2A-r* blasts and ML-2 cells, overexpression of *HOXA10-AS* enhanced leukemic growth. Inversely, we observed significantly reduced leukemic growth upon shRNA-mediated knockdown of *HOXA10-AS* in *KMT2A-r* compared with non-*KMT2A-r* cell lines, suggesting the dependency of *KMT2A-r* AMLs on high *HOXA10-AS* expression. For further confirmation, we additionally used CRISPR/Cas9 to excise the *HOXA10-AS* promoter and transcription start site in vitro, which yielded similar results as the above approaches. LNA-GapmeR-mediated *HOXA10-AS* downregulation also led to decreased proliferation in *KMT2A-r* leukemic cells compared with non-*KMT2A-r* cells. LNA-GapmeRs can be taken up by cells via gymnosin,²⁶ eliminating the need for delivery vehicles and thus making them an elegant therapeutic option for patients with *KMT2A-r* AML. To advance this idea, we provided a proof of concept for therapeutic targeting of *HOXA10-AS*: patient-derived AML blasts transduced with shRNAs against *HOXA10-AS* were outcompeted by their control-transduced counterparts in vivo. These experiments pave the way for future preclinical studies with anti-*HOXA10-AS* therapeutics.

Pediatric AML patients with *KMT2A-r* tend to be younger and predominantly present with a monocytic/monoblastic subtype.⁴¹ In line with this, lentiviral *HOXA10-AS* expression in CD34⁺ HSPCs caused a significant block of monocytic differentiation. Aberrant *HOX* expression is a hallmark of *KMT2A-r* leukemias, and the contribution of several *HOXA* genes and miR-196b to *KMT2A-r* leukemogenesis has been previously described.¹⁵⁻¹⁷ Many lncRNAs have been shown to act as local regulators influencing the expression of nearby genes.³³ Moreover, other *HOX* lncRNAs such as *HOTTIP* and *HOTAIR* reportedly act in *cis* or *trans* to directly regulate the expression of *HOX* genes.^{11,13} For example, forced expression of *HOTAIR* causes genome-wide expression changes in epithelial

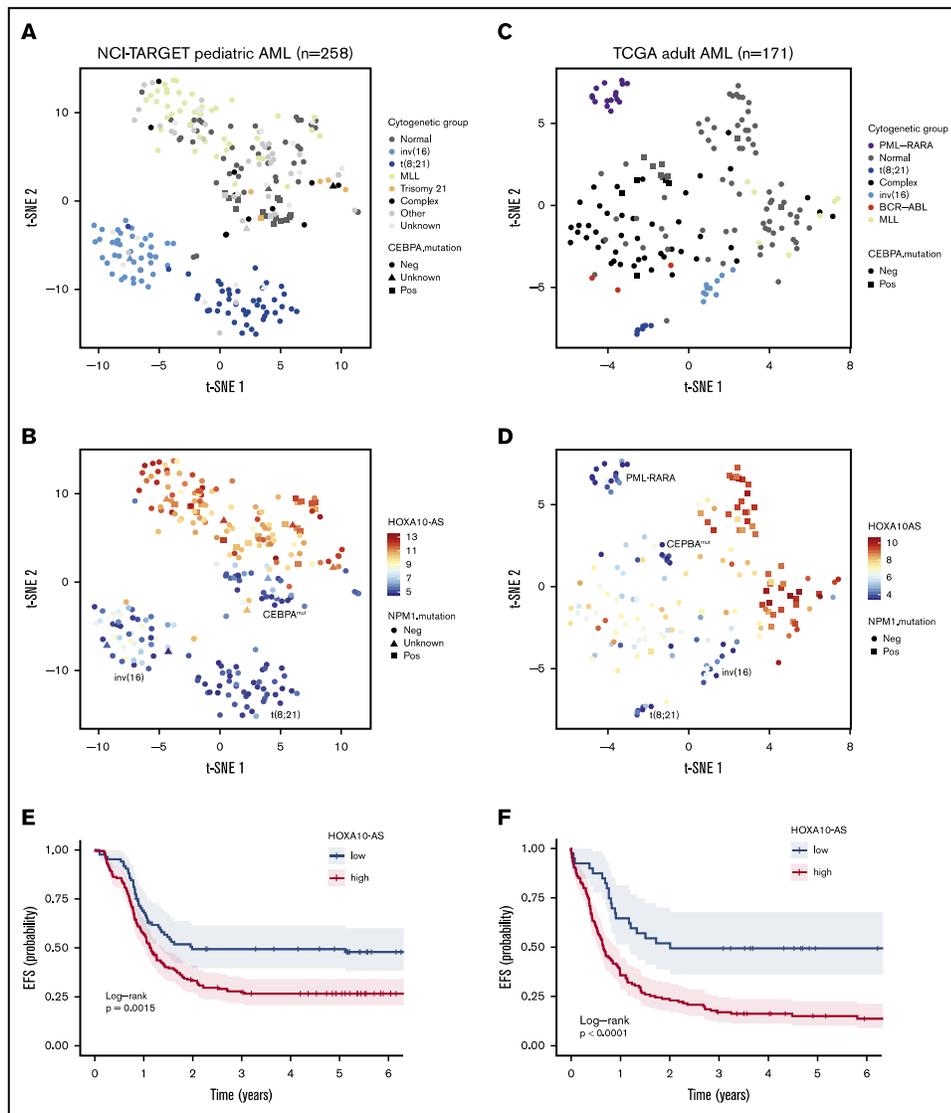


Figure 5. *HOXA10-AS* is a prognostic factor in AML. Analysis of RNA-sequencing data from 258 NCI-TARGET pediatric³⁵ (A-B) and 171 TCGA adult³⁶ (C-D) AML samples. (A) t-SNE representation using the 4362 most variable genes (interquartile range > 1.5), with samples colored according to AML subtype. (B) t-SNE as in panel A with samples colored according to *HOXA10-AS* expression as indicated by the color key. (C) t-SNE representation using the 1840 most variable genes (interquartile range > 1.5), with samples colored according to AML subtype. (D) t-SNE as in panel C with samples colored according to *HOXA10-AS* expression as indicated by the color key. (E) Probability of EFS in 258 NCI-TARGET pediatric AML patients with high (red; >5.5 normalized reads; cutoff determined via maximally selected rank statistics) or low *HOXA10-AS* expression (blue; ≤5.5 normalized reads). (F) Probability of EFS in 171 TCGA adult AML patients with high (red; >4.6 normalized reads; cutoff determined via maximally selected rank statistics) or low *HOXA10-AS* expression (blue; ≤4.6 normalized reads).

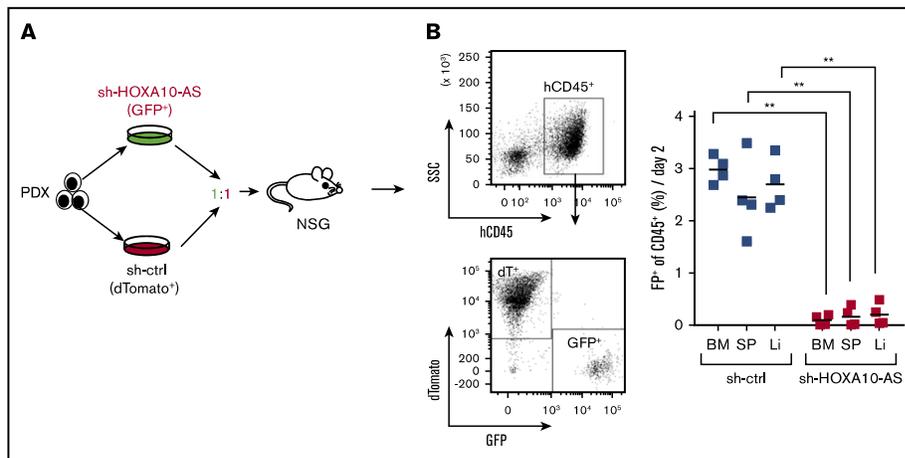


Figure 6. *HOXA10-AS* downregulation impairs leukemic growth in vivo. (A) Experimental design for *HOXA10-AS* knockdown in vivo in a patient-derived xenograft (PDX) model of AML. (B) PDX engraftment levels (dTomato⁺ or GFP⁺) in the bone marrow (BM), spleen (Sp), and liver (Li) in recipient mice after leukemia onset, displayed as percentage of transduced human CD45⁺ cells (right; unpaired Student *t* test). Representative FACS plots (left) of the bone marrow show the gating strategy to assess the percentage of fluorescent cells. NSG, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; SSC, side scatter.

cancer cells, thereby increasing breast cancer invasiveness and metastasis via a mechanism that is still under debate.^{42,43} In contrast, *HOTTIP* coordinates the activation of several 5' *HOXA* genes in *cis* by directing the WDR5/MLL complexes.¹³ Therefore, we first evaluated the effect of *HOXA10-AS* perturbation on antisense *HOX* genes and miR-196b. However, using shRNA-mediated knockdown and genetically clean CRISPR/Cas9 excision of the transcription start site, we could not prove a local regulatory function of *HOXA10-AS*. These data together with data showing cytoplasmic localization of *HOXA10-AS* and the transcriptional changes induced upon its lentiviral expression favor a model wherein *HOXA10-AS* regulates gene expression in *trans*. Via global gene expression analysis, we saw that *HOXA10-AS* activated several NF- κ B target genes. NF- κ B is constitutively active in many AML cases, particularly in monocytic/monoblastic leukemias, and has been suggested as a therapeutic target.⁴⁴⁻⁴⁶ Corroborating NF- κ B as a possible target of *HOXA10-AS*, we demonstrated increased p65 phosphorylation, an indicator of NF- κ B activation, in *HOXA10-AS*-overexpressing ML-2 cells. In addition, inhibiting the NF- κ B pathway using the I κ B kinase inhibitor BMS-345541 rescued the growth advantage in *HOXA10-AS*-overexpressing ML-2 cells as well as the monocytic differentiation block induced by ectopic *HOXA10-AS* in HSPCs. These results indicate that aberrant activation of the NF- κ B pathway might be a mechanism through which *HOXA10-AS* overexpression blocks monocytic differentiation in HSPCs and contributes to the oncogenic phenotype of *KMT2A-r* cells, which mainly manifest as monocytic/monoblastic leukemias. Although exact mechanisms have yet to be fully elucidated, our work adds *HOXA10-AS* to the list of lncRNAs within the *HOX* clusters that coordinate gene expression and crucial signaling pathways.

In conclusion, our work uncovers *HOXA10-AS* as an important regulator of HSC homeostasis and hematopoietic differentiation

and as a potential therapeutic target for *KMT2A-r* AMLs, given its essentiality in this cytogenetic subtype. These findings place *HOXA10-AS* among the growing list of functionally validated lncRNAs with crucial roles in normal and malignant hematopoiesis and in the broader scope provides further evidence of the significance of lncRNAs to pathophysiological processes.

Acknowledgments

The authors thank D. Trono of EPFL, Lausanne, Switzerland, for kindly providing both pMD2.G (Addgene plasmid 12259) and psPAX2 (Addgene plasmid 12260).

This work was supported by funding to J.-H.K. from the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement 714226). J.-H.K. is a recipient of the St. Baldrick's Robert J. Arceci Innovation Award. D.H. and S.A.-K. are supported by German Cancer Aid (grants 111743 and 70112219).

Authorship

Contribution: S.A.-K. performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript; R.B., M.N., L.V., and S.E. performed experiments, analyzed the data, and revised the manuscript; L.G. performed experiments; A.S. analyzed and interpreted the data and revised the manuscript; T.S. provided material and/or data and revised the manuscript; and D.H. and J.-H.K. designed the study, analyzed and interpreted the data, wrote the manuscript, and academically drove the project.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: L.V., 0000-0002-3926-2417; S.E., 0000-0002-0537-4242; J.-H.K., 0000-0002-1070-0727.

Correspondence: Jan-Henning Klusmann, Pediatric Hematology and Oncology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Str 40, 06120 Halle, Germany; e-mail: jan-henning.klusmann@uk-halle.de;

and Dirk Heckl, Pediatric Hematology and Oncology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Str 40, 06120 Halle; e-mail: dirk.heckl@uk-halle.de.

References

1. Liu G, Mattick JS, Taft RJ. A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life. *Cell Cycle*. 2013;12(13):2061-2072.
2. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47(3):199-208.
3. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*. 2012;22(9):1775-1789.
4. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*. 2011;25(18):1915-1927.
5. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood*. 1999;94(11):3707-3716.
6. Cimino G, Rapanotti MC, Elia L, et al. ALL-1 gene rearrangements in acute myeloid leukemia: association with M4-M5 French-American-British classification subtypes and young age. *Cancer Res*. 1995;55(8):1625-1628.
7. Milne TA, Briggs SD, Brock HW, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. 2002;10(5):1107-1117.
8. Zeisig BB, Milne T, Garcia-Cuellar MP, et al. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol*. 2004;24(2):617-628.
9. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(25):12223-12227.
10. Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev*. 2003;17(18):2298-2307.
11. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-1323.
12. Zhang X, Lian Z, Padden C, et al. A myelopoiesis-associated regulatory intergenic noncoding RNA transcript within the human HOXA cluster. *Blood*. 2009;113(11):2526-2534.
13. Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. 2011;472(7341):120-124.
14. Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, et al. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2002;16(2):186-195.
15. Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J, et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood*. 2001;97(8):2286-2292.
16. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*. 1997;17(11):495-505.
17. Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, et al. Regulation of miR-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*. 2009;113(14):3314-3322.
18. Schotte D, Lange-Turenhout EA, Stumpel DJ, et al. Expression of miR-196b is not exclusively MLL-driven but is especially linked to activation of HOXA genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(10):1675-1682.
19. Schwarzer A, Emmrich S, Schmidt F, et al. The non-coding RNA landscape of human hematopoiesis and leukemia. *Nat Commun*. 2017;8:218.
20. Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, et al. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Reports*. 2013;5(6):1704-1713.
21. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014;32(9):941-946.
22. Reimer J, Knöb S, Labuhn M, et al. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells in vivo. *Haematologica*. 2017;102(9):1558-1566.
23. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGFβ and Wnt signaling. *Genes Dev*. 2014;28(8):858-874.
24. Klusmann JH, Li Z, Böhmer K, et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Genes Dev*. 2010;24(5):478-490.
25. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, et al. Endogenous tumor suppressor microRNA-193b: therapeutic and prognostic value in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(10):1007-1016.
26. Stein CA, Hansen JB, Lai J, et al. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(1):e3.

27. Klusmann JH, Godinho FJ, Heitmann K, et al. Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. *Genes Dev.* 2010;24(15):1659-1672.
28. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 1990;8(5):813-819.
29. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53(282):457-481.
30. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):163-170.
31. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
32. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012;28(6):882-883.
33. Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature.* 2016;539(7629):452-455.
34. Wang D, Baldwin AS Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29411-29416.
35. Bolouri H, Farrar JE, Triche T Jr., et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions [published correction appears in *Nat Med.* 2018;24(4):526]. *Nat Med.* 2018;24(1):103-112.
36. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al; Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074.
37. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal.* 2003;43(2):121-137.
38. Lausen B, Hothorn T, Bretz F, Schumacher M. Assessment of optimal selected prognostic factors. *Biom J.* 2004;46(3):364-374.
39. Sessa L, Breiling A, Lavorgna G, Silvestri L, Casari G, Orlando V. Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *RNA.* 2007;13(2):223-239.
40. Sasaki YT, Sano M, Kin T, Asai K, Hirose T. Coordinated expression of ncRNAs and HOX mRNAs in the human HOXA locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(3):724-730.
41. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2682-2689.
42. Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010;464(7291):1071-1076.
43. Portoso M, Ragazzini R, Brenčić Ž, et al. PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 2017;36(8):981-994.
44. Baumgartner B, Weber M, Quirling M, et al. Increased IκappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia.* 2002;16(10):2062-2071.
45. Kuo HP, Wang Z, Lee DF, et al. Epigenetic roles of MLL oncoproteins are dependent on NF-κB. *Cancer Cell.* 2013;24(4):423-437.
46. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2001;98(8):2301-2307.

Downloaded from https://ashpublications.org/blood/advance-article-pdf/doi/10.1182/blood-2019-11-814252/1549909/advance032029.pdf by guest on 01 January 2020

Anhänge

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, 14.11.2020

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Hamburg, 14.11.2020

Ort, Datum

Unterschrift