

10. Sep. 2015

An Interaction between Additional Sex Comb
Like Transcriptional Regulators and
CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha in
Myeloid Malignancies

Progress Report an die Hamburger
Krebsgesellschaft e.V.

Piet Sonnemann
Georg-Wilhelm-Straße 11
21107 Hamburg
Tel.: +49 174 9297381
Email: piet.sonnemann@gmx.net

30. August 2015

Anliegen

Sehr geehrte Damen und Herren der Hamburger Krebsgesellschaft,

Zunächst möchte ich mich bei Ihnen für die Förderung bedanken. Desweiteren freue mich sehr, Ihnen die bisher erzielten Ergebnisse der von Ihnen geförderten Forschungsarbeit zu erläutern, und Ihnen einen Ausblick auf weitere Experimente und Vorhaben zu geben.

Ich würde mich sehr über Rückfragen, Anregungen und Kritik freuen.

Mit freundlichen Grüßen,

Piet Sonnemann,
Hamburg, den 30. August 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	3
1.1	Überblick: C/EBP α und ASXL Proteine	3
1.1.1	ASXL1, ASXL2 und ASXL3	3
1.1.2	C/EBP α	4
2	Zusammenfassung	5
3	Progress Report	6
3.1	Interaktion zwischen C/EBP α und ASXL1	6
3.2	Differentielle Expression von ASXL Proteinen	7
3.3	Regulation von ASXL Proteinen durch CEBP α	10
4	Experimenteller Ausblick	12
4.1	Identifikation der mit ASXL-Proteinen assoziierten Gene	12
4.2	Bindungsstellen des ASXL1-C/EBP α -Komplexes	12
4.3	Bestimmung von ASXL-Interaktionspartnern durch Massenspek- trometrie	12
4.4	Knockdown von ASXL, ASXL2 und ASXL3 <i>in vitro</i>	13
5	Literaturverzeichnis	15

Kapitel 1

Einführung

Seit dem 01.02.2015 fördert die Hamburger Krebsgesellschaft das Projekt "An Interaction between Additional Sex Comb Like Transcriptional Regulators and CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha in Myeloid Malignancies". Dieses Projekt wird in der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Christopeit als Promotionsarbeit des medizinischen Doktoranden Piet Sonnemann bearbeitet.

Das Ziel des Projekts ist, bisher unbekannte Entstehungswege für Leukämien aufzuschlüsseln. Es soll hierbei ein spezieller Fokus auf Faktoren gelegt werden, die in epigenetische Regulationsmechanismen eingebunden sind.

Neben vielen anderen sind für diese epigenetischen Regulationsprozesse zwei Gruppen von Proteinen verantwortlich: Die Trithorax-Gruppe, die Gene aktiviert und die Polycomb-Gruppe, die Gene hemmt. Beide dieser Gruppen interagieren mit einer Familie von Proteinen, die als ASXL Familie bekannt ist. Mitglieder der ASXL Familie sind in frühen Stadien der Transformation von gesunden zu leukämischen Zellen mutiert.

Da bisher wenig über diese Proteinfamilie bekannt ist, wollen wir sie genauer untersuchen und ihre jeweiligen Aufgaben mit molekularbiologischen Techniken entschlüsseln.

Des Weiteren wollen wir untersuchen, inwieweit $CEBP\alpha$, ein für die normale Entwicklung von blutbildenden Zellen notwendiger Transkriptionsfaktor, regulatorischen Einfluss auf die Mitglieder der ASXL Familie und damit auf die Balance der Trithorax- und der Polycombgruppe nimmt.

1.1 Überblick: C/EBP α und ASXL Proteine

1.1.1 ASXL1, ASXL2 und ASXL3

Das Protein *asx* wurde zunächst in *Drosophila melanogaster* beschrieben. In diesem Organismus interagiert es mit Komponenten der aktivierenden Trithorax- und der reprimierenden Polycombgruppe, die Genexpression regulieren, indem sie Histone chemisch modifizieren. [1] In Säugetieren existieren drei konservierte homologe Proteine zu *asx*, ASXL1, ASXL2 und ASXL3.

Von diesen Proteinen sind ASXL1 und ASXL2 bereits als mutierte Proteine in Leukämie beschrieben. Mutationen in beiden Proteinen korrelieren mit einem adversen Survival in Patienten. [2] [3] [3] [4] [5] Auf molekularer Ebene ist insbesondere die Rolle von ASXL1 in der Leukämogenese ist verhältnismäßig

gut erforscht. Mutationen in diesem Protein führen zu einem Verlust von Genrepression durch Verringerung der Polycomb-Repressive Complex 2-Aktivität [6], sowie ein Anstieg der Aktivität des PR-DUB Komplexes. [7]

ASXL3-Mutationen wurden in Melanomen identifiziert. [8]

1.1.2 C/EBP α

C/EBP α ist ein hervorragend erforschter Master-Regulator der Differenzierung von multipotenten myeloischen Vorläuferzellen und ist unabdingbar für die Entstehung von GMPs (*granulocyte macrophage progenitor*) aus CMPs (*common myeloid progenitors*). [9] Desweiteren ist C/EBP α notwendig für die Selbsterneuerungsfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen, aber auch für einen Arrest des Zellzyklus und somit der Proliferation. [10][11]

CEBP α tritt in zwei Isoformen auf, einer trunkierten p30 Form und einer p42 Isoform. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die p30-Isoform ausreichend für die Differenzierung zu GMPs ist, allerdings nicht in der Lage ist, die Proliferation zu kontrollieren. Diese Mäuse entwickelten akute myeloische Leukämie mit vollständiger Penetranz. [12]

Es existieren einige Studien, die eine Rolle von C/EBP α für die epigenetische Regulation in hämatopoetischen Zellen postulieren. [11] [13] In unserem Arbeitsmodell bindet C/EBP α Mitglieder der ASXL Familie und reguliert so, über Trithorax- und/oder Polycomb-Gruppe die epigenetische Konfiguration von Stammzellen.

Kapitel 2

Zusammenfassung

ASXL Proteine sind differentiell zwischen verschiedenen Zellreihen exprimiert.

Im Rahmen unserer Forschung konnten wir zeigen, dass ASXL1 und C/EBP α interagieren. Diese Interaktion wurde unabhängig von uns bereits in einer anderen Gruppe in einem massenspektrometrischen Screen gefunden, jedoch noch nicht weiter charakterisiert. Desweiteren zeigt sich, dass ASXL Proteine während Differenzierungsprozessen von Stammstellen hierarchisch exprimiert sind.

Induktion von C/EBP α hat lediglich einen geringen Einfluss auf die Expression von ASXL1 und ASXL2. Die Expression von ASXL3 wird durch p30 C/EBP α supprimiert. Weiterhin scheint p42-C/EBP α eine alternative Isoform oder eine posttranslationale Modifikation von ASXL3 zu induzieren.

Es stehen weiterhin Experimente aus, die von ASXL Proteinen und vom ASXL1-C/EBP α Komplex regulierte Gene identifizieren sollen (Chromatin-Immunpräzipitation), eine genauere massenspektrometrische Analyse des ASXL1-C/EBP α -Komplexes und ein Knockdown von ASXL1, ASXL2 und ASXL3 in leukämischen Zellreihen.

Weiterhin soll, angestoßen durch unabhängige Microarray-Daten, die Expression von ASXL Proteinen während der physiologischen Hämatopoese untersucht werden.

Kapitel 3

Progress Report

3.1 Interaktion zwischen C/EBP α und ASXL1

Wir konnten eine Interaktion zwischen C/EBP α und ASXL1 mittels Immunpräzipitation im endogenen Kontext einer humanen Zelllinie (UKE-1) nachweisen. Hierfür wurden Protein-G gekoppelte Agarose Beads mit Antikörpern gegen ASXL1, C/EBP α , und einem Kontrollimmunglobulin gekoppelt, gefolgt von einer vierstündigen Inkubation mit Zelllysaten. Gebundene Proteine wurden durch Erhitzung bei 70°C für 10min von den Beads eluiert, gefolgt von 1D SDS-Gelelektrophorese und Westernblot nach C/EBP α und ASXL1.

Wir konnten diese Interaktion mit C/EBP α bis dato nicht für die Proteine ASXL2 und ASXL3 nachweisen. Im Westernblot nach Immunpräzipitation zeigte sich kein Signal.

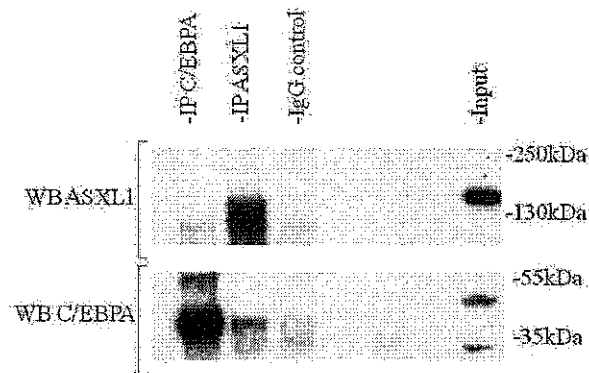


Abbildung 3.1: Immunpräzipitation wurde mit Protein G-Agarose Beads und entsprechenden Antikörpern gegen ASXL1 und C/EBP α durchgeführt, gefolgt von Westernblot nach C/EBP α und ASXL1. Als Negativkontrolle dient eine IgG-Kontrolle (Kaninchen). Als Input wurden 10 μ l des in der Immunpräzipitation verwendeten Lysates benutzt.

Zu sehen ist, dass C/EBP α mit ASXL1 co-immunpräzipitiert wurde. Auch ASXL1 wiederum scheint mit C/EBP α co-präzipitiert zu sein, aufgrund von

schwachen Signalen ist aber eine definitive Aussage schwer zu treffen. Weitere Optimierung ist hier vonnöten.

Diese Interaktion soll weiterhin untersucht werden, ob die Expression von ASXL1 notwendig für die Differenzierung von leukämischen Zellen ist. Hierfür soll ASXL1 in C/EBP α -induzierbaren K562 Zellen mittels shRNA antagonisiert werden.

3.2 Differentielle Expression von ASXL Proteinen

Mittels Westernblot konnten wir zeigen, dass die Expression von ASXL1, ASXL2 und ASXL3, sowie die von C/EBP α zwischen verschiedenen AML Zelllinien stark variiert. Während bei C/EBP α hierrüber bereits viele Daten vorhanden sind, sind die meisten dieser Zellreihen noch nicht nach ihrer Expression von ASXL1 untersucht worden. Es liegen in der Literatur diesbezüglich keine Daten für ASXL2 und ASXL3 vor.

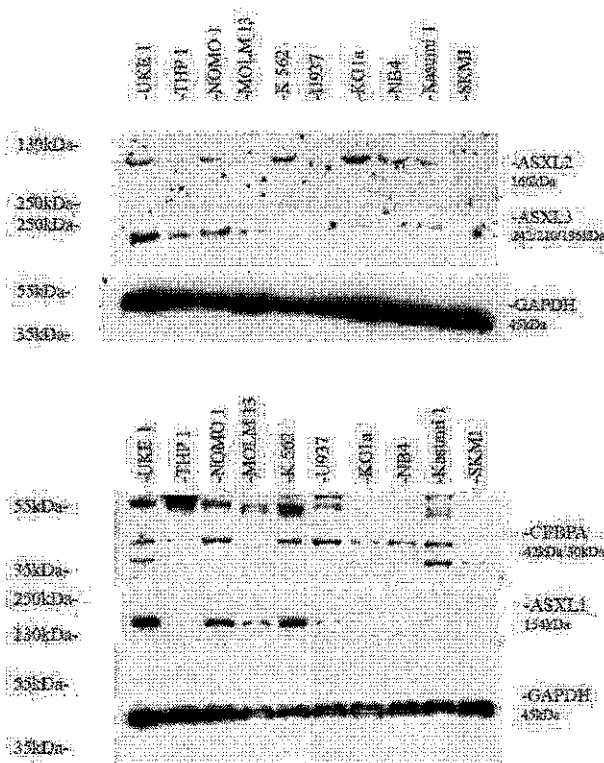


Abbildung 3.2: Pro Zellysat wurden 40 μ g Vollprotein pro Lane eingesetzt. Nach 1D Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde mittels den entsprechenden Antikörpern gegen ASXL1, ASXL2, ASXL3, und C/EBP α geblotet. GAPDH dient als Kontrollprotein.

Durch Auswertung unabhängiger Studien konnten wir die Expression von

ASXL Proteinen auf verschiedenen Ebenen der gängigen Stammzellhierarchie zeigen. Die unserer Analyse zugrundeliegenden Daten wurden von anderen Forschungsgruppen erhoben und sind öffentlich zugänglich. [14]

Auffällig bei dieser Untersuchung ist, dass ASXL1, ASXL2 und ASXL3 von unspezialisierten Zellen mit hohen Stammzeleigenschaften zu spezialisierteren Zellen (LTHSC \rightarrow STHSC \rightarrow Progenitor) stark differentiell exprimiert sind (siehe Abbildung 3.3). Dies legt unterschiedliche Funktionen nahe, die nun weiter charakterisiert werden sollen.

Als Arbeitshypothese postulieren wir, dass ASXL2 ein Differenzierungsfaktor, da die Expression von undifferenzierten zu differenzierteren Stammzellen hin zunimmt, während ASXL3 auf Grund seiner gegenläufigen Expression ein Stammzellfaktor zu sein scheint.

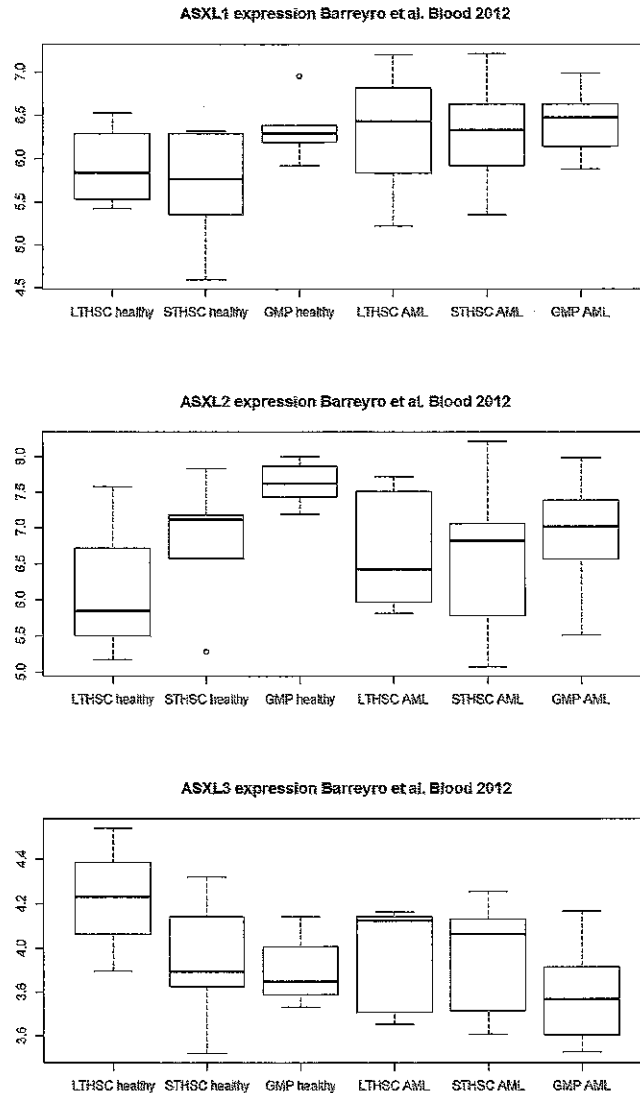


Abbildung 3.3: Expression von ASXL Proteinen im hämatopoetischen Kompartiment. LTHS=long term hematopoietic stem cell (*Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺*) STHSC=short term hematopoietic stem cell (*Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻, CD90⁻*) GMP=granulocyte monocyte progenitor (*Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD45RA⁺, CD123⁺*)

Da diese Daten Microarray-basiert sind, planen wir, diese per qPCR zu verifizieren. Hierzu sollen primäre humane Proben mittels fluorescence-assisted cell sorting und geeigneten Oberflächenmarkern gewonnen werden (siehe Abbildung 3.2), mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und schlussendlich amplifiziert werden.

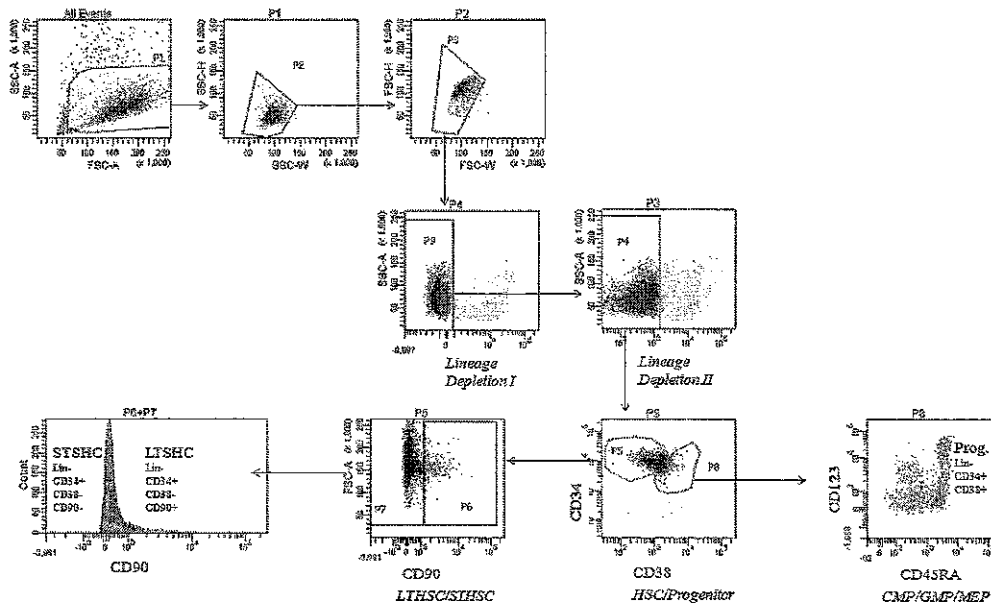


Abbildung 3.4: Sorting Schema: Primäres Knochenmark wird zunächst mittels magnetischer Zellseparation nach CD34 aufgereinigt, gefolgt von der Exclusion von Zellen, die Marker des Lineage Commitments exprimieren.

CD34+ Zellen stellen den Stammzellpool des Knochenmarks dar, die nach CD90 und CD38 in long term hematopoietic stem cell (LTHSC) mit einem hohen Langzeitregenerationspotential, short term hematopoietic stem cells (STHSC) mit einem geringeren Regenerationspotential und Progenitorzellen, die bereits nicht mehr in der Lage sind sämtliche Zellen des Blutes zu bilden, aufgeteilt werden können. Progenitorzellen können weiterhin in verschiedene Gruppen durch CD45RA und CD123 eingeteilt werden.

Das Sorting der entsprechenden Proben konnte bereits erfolgreich etabliert werden, allerdings ist bei der Transkriptom-Amplifikation noch Optimierung vonnöten. Es wird angestrebt zunächst zehn individuelle Proben zu sortieren und zu untersuchen.

3.3 Regulation von ASXL Proteinen durch CEBP α

Prof. Behre aus Leipzig stellte und freundlicherweise ER-CEBP α -K562 Zellen zur Verfügung. Diese Zellen exprimieren ein Fusionsprodukt aus Estrogenrezeptor und der P42 bzw. der P30 Isoform CEBP α s. Durch Behandlung dieser Zellen mit Estradiol, wird CEBP α aktiv, und die Zellen differenzieren.

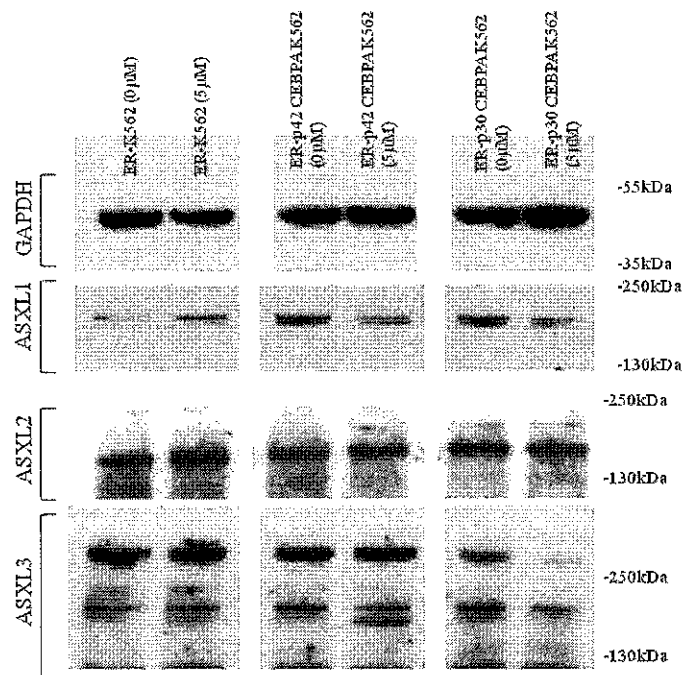


Abbildung 3.5: *ASXL1*, *ASXL2* und *ASXL3* Proteineexpression nach *CEBPa* Induktion. Estrogenrezeptor-*CEBPa*-Fusionsprotein exprimierende Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M β -Estradiol behandelt, gefolgt von Zellyse und 1D SDS Gelelektrophorese. Immunoblot wurde mit gegen *ASXL1*, *ASXL2*, *ASXL3* und *GAPDH* als Kontrollprotein durchgeföhrt. Anzumerken ist der Abfall von *ASXL3* nach p30-*CEBPa*-Induktion und das auftreten einer weiteren Bande im Blot nach *ASXL3* nach Induktion von P42-*CEBPa*. Der Erfolg der Induktion von *C/EBPa* wurde mittels Flowcytometrie nach *CD11b* und *CD14* verifiziert.

Wir vermuten, dass es sich bei der zusätzlichen Bande um eine Isoform des Proteins *ASXL3* oder eine posttranslationalmodifizierte Version handelt. Zur Untersuchung mittels Massenspektrometrie wollen wir das fragliche Protein durch Immunpräzipitation mit einem *ASXL3*-Antikörper isolieren, durch 1D Gelelektrophorese und Coomassie-Staining dargestellt und die Bande exzisieren.

Kapitel 4

Experimenteller Ausblick

4.1 Identifikation der mit ASXL-Proteinen assoziierten Gene

Die Gene, die mit ASXL1, ASXL2, und ASXL3 assoziiert sind, sollen mittels Chromatin-Immunpräzipitation identifiziert werden. Zunächst werden Protein/DNA-Interaktionen durch Formaldehyde-Crosslinking fixiert, gefolgt von einer Immunpräzipitation. Mittels qPCR sollen dann bestimmte genomische Regionen amplifiziert werden. Diese Regionen stellen bekannte Regionen, an denen ASXL-Proteine binden dar, und sollen als Positivkontrolle dienen. Als Negativkontrolle dient der Promoter des Gens RRP1, ein rRNA-prozessierendes Protein, das keine Regulation durch ASXL Proteine zeigen sollte.

Nach Validierung der Ergebnisse soll schlussendlich die präzipitierte DNA sequenziert werden. So wird ein großer Datensatz mit genomweiten ASXL1-, ASXL2- und ASXL3-Bindungsstellen entwickelt, der weiterhin bioinformatisch analysiert werden muss. Die dafür nötigen Kenntnisse besitzt der Betreuer dieser Arbeit, PD Dr. med. Christopeit.

4.2 Bindungsstellen des ASXL1-C/EBP α -Komplexes

In einem vergleichbaren Experiment sollen die genomischen Bindungsstellen des Proteinkomplexes von ASXL1 und C/EBP α gefunden werden. Hierfür wird eine sequentielle Chromatinimmunpräzipitation durchgeführt, bei der, nach einer initialen Immunpräzipitation nach C/EBP α , gefolgt von Eluierung und einer Immunpräzipitation nach ASXL1 folgt.

Somit werden Loci isoliert, die sowohl von C/EBP α als auch von ASXL1 belegt sind, die wiederum sequenziert werden können.

4.3 Bestimmung von ASXL-Interaktionspartnern durch Massenspektrometrie

Die durch Immunpräzipitation angereicherte ASXL-Proteinkomplexe sollen durch Massenspektrometrie weiter charakterisiert werden. Hierfür sollen die individuel-

len Protein durch 1D-Gelelektrophorese und Coomassie-Staining isoliert werden, gefolgt von Trypsin-Verdauung und der Analyse der Massenspektrometrischen Core Facility des UKE.

Die Resultate sollen Aufschluss darüber geben, in welchen Proteinkomplexen ASXL Proteine vorliegen und wie Sie ihre Wirkung entfalten. Ihre Interaktionspartner sind von entscheidender Bedeutung, da ASXL Proteine keine eigene enzymatische Aktivität aufweisen und Histonmodifikationen über andere Faktoren gesetzt werden.

4.4 Knockdown von ASXL, ASXL2 und ASXL3 *in vitro*

Die Rolle von ASXL2 und ASXL3 in der Leukämogenese ist kaum bekannt. Um diese genauer zu charakterisieren soll mittels shRNA Interferenz die Expression von ASXL Proteinen zunächst herunterreguliert werden, und diese Zellen daraufhin auf ihr Proliferationsverhalten und ihr Differenzierungsvermögen untersucht werden. Aufgrund der Expressionsdaten aus anderen Studien wird vermutet, dass ASXL2 als Differenzierungsfaktor agiert, während ASXL3 als Stammzellfaktor fungiert.

Die fraglichen shRNA-Konstrukte wurden bereits von Sigma Aldrich erworben. Experimentell sollen diese mittels lentiviralen Vektoren in Zielzelllinien integriert werden. Geeignete Zelllinien wären HL60, eine promyelozytäre Leukämiezelllinie, die in der Lage ist, sowohl monozytär-macrophagoid, als auch granulozytär zu differenzieren, und UKE-1, die eine hohe Expression der fraglichen Proteine aufweist.

Nach chemischer Selektion der transduzierten Zellen soll zunächst die Knockdown-Effizienz mittels Westernblot qualitativ, und mittels qPCR quantitativ verifiziert werden. In weiteren Experimenten sollen folgende Eigenschaften der Knockdown-Zellreihen ermittelt werden:

Zellwachstum Das Zellwachstum soll durch manuelle Zellzählung von vitalen Zellen durch Trypan-Blau-Exklusion bestimmt werden.

Morphologie Zunächst werden die resultierenden Knockdown-Zellen durch May-Giemsa-Grünwald-Färbung untersucht. Größere Veränderungen, wie etwa Differenzierung der unreifen Leukämiezellen lassen sich so bestimmen.

Differenzierungsfähigkeit Einige Zellreihen lassen sich durch Chemikalien, wie all-trans-Retinsäure (ATRA) und Tetradeacylphorbolacetat (TPA) ausdifferenzieren. Es ist möglich, dass diese Fähigkeit nach Knockdown reduziert oder gesteigert ist. Die Differenzierung lässt sich Kennzeichnen durch eine verringerte Zellteilungsrate, erhöhte Expression von bestimmten Oberflächenmarkern (bei HL60 z.B. CD11b) und morphologische Veränderungen.

Geneexpression Verlust der Expression von ASXL1 führt zu einer erhöhten Expression von HOXA Proteinen, die wiederum ein hohes onkogenes Potential besitzen. Mittels qPCR soll untersucht werden, ob ein Knockdown von ASXL2 und ASXL3 ebenfalls zu diesem Effekt führt. Dies ist denkbar, da ASXL Proteine ein hohes Maß an strukturellen Übereinstimmungen zeigen.[15]

Ein weiteres Experiment stellt der Knockdown von ASXL1 in C/EBP α -induzierbaren Zellen dar. Nach ASXL1-Knockdown sollen Isoformen C/EBP α s mit Estradiol induziert werden. So kann die physiologische Rolle des C/EBP α -ASXL1 Komplexes untersucht werden.

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

- [1] C. L. Fisher, N. Pineault, C. Brookes, C. D. Helgason, H. Ohta, C. Bodner, J. L. Hess, R. K. Humphries, and H. W. Brock. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*, 115(1):38–46, Jan 2010.
- [2] V. Gelsi-Boyer, V. Trouplin, J. Adelaide, J. Bonansea, N. Cervera, N. Carbuccia, A. Lagarde, T. Prebet, M. Nezri, D. Sainty, S. Olschwang, L. Kerri, M. Chaffanet, M. J. Mozziconacci, N. Vey, and D. Birnbaum. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 145(6):788–800, Jun 2009.
- [3] K. H. Metzeler, H. Becker, K. Maharry, M. D. Radmacher, J. Kohlschmidt, K. Mrozek, D. Nicolet, S. P. Whitman, Y. Z. Wu, S. Schwind, B. L. Powell, T. H. Carter, M. Wetzler, J. O. Moore, J. E. Kolitz, M. R. Baer, A. J. Carroll, R. A. Larson, M. A. Caligiuri, G. Marcucci, and C. D. Bloomfield. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*, 118(26):6920–6929, Dec 2011.
- [4] J. Boultonwood, J. Perry, A. Pellagatti, M. Fernandez-Mercado, C. Fernandez-Santamaria, M. J. Calasanz, M. J. Larrayoz, M. Garcia-Delgado, A. Giagounidis, L. Malcovati, M. G. Della Porta, M. Jadersten, S. Killick, E. Hellstrom-Lindberg, M. Cazzola, and J. S. Wainscoat. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 24(5):1062–1065, May 2010.
- [5] J. B. Micol, N. Duployez, N. Boissel, A. Petit, S. Geffroy, O. Nibourel, C. Lacombe, H. Lapillonne, P. Etancelin, M. Figeac, A. Renneville, S. Castaigne, G. Leverger, N. Ifrah, H. Dombret, C. Preudhomme, O. Abdel-Wahab, and E. Jourdan. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations. *Blood*, 124(9):1445–1449, Aug 2014.
- [6] O. Abdel-Wahab, M. Adli, L. M. LaFave, J. Gao, T. Hricik, A. H. Shih, S. Pandey, J. P. Patel, Y. R. Chung, R. Koche, F. Perna, X. Zhao, J. E.

- Taylor, C. Y. Park, M. Carroll, A. Melnick, S. D. Nimer, J. D. Jaffe, I. Aifantis, B. E. Bernstein, and R. L. Levine. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*, 22(2):180–193, Aug 2012.
- [7] A. Balasubramani, A. Larjo, J. A. Bassein, X. Chang, R. B. Hastie, S. M. Togher, H. Lahdesmaki, and A. Rao. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun*, 6:7307, 2015.
- [8] L. Ding, M. Kim, K. L. Kanchi, N. D. Dees, C. Lu, M. Griffith, D. Fenstermacher, H. Sung, C. A. Miller, B. Goetz, M. C. Wendl, O. Griffith, L. A. Cornelius, G. P. Linette, J. F. McMichael, V. K. Sondak, R. C. Fields, T. J. Ley, J. J. Mule, R. K. Wilson, and J. S. Weber. Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS ONE*, 9(11):e111153, 2014.
- [9] D. E. Zhang, P. Zhang, N. D. Wang, C. J. Hetherington, G. J. Darlington, and D. G. Tenen. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein in alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(2):569–574, Jan 1997.
- [10] P. F. Johnson. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J. Cell. Sci.*, 118(Pt 12):2545–2555, Jun 2005.
- [11] M. S. Hasemann, F. K. Lauridsen, J. Waage, J. S. Jakobsen, A. K. Frank, M. B. Schuster, N. Rapin, F. O. Bagger, P. S. Hoppe, T. Schroeder, and B. T. Porse. CEBPalpha is required for long-term self-renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors. *PLoS Genet.*, 10(1):e1004079, Jan 2014.
- [12] P. Kirstetter, M. B. Schuster, O. Bereshchenko, S. Moore, H. Dvinge, E. Kurz, K. Theilgaard-Monch, R. Mansson, T. A. Pedersen, T. Pabst, E. Schrock, B. T. Porse, S. E. Jacobsen, P. Bertone, D. G. Tenen, and C. Nerlov. Modeling of C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell*, 13(4):299–310, Apr 2008.
- [13] E. Ohlsson, M. S. Hasemann, A. Willer, F. K. Lauridsen, N. Rapin, J. Jendholm, and B. T. Porse. Initiation of MLL-rearranged AML is dependent on C/EBPalpha. *J. Exp. Med.*, 211(1):5–13, Jan 2014.
- [14] L. Barreyro, B. Will, B. Bartholdy, L. Zhou, T. I. Todorova, R. F. Stanley, S. Ben-Neriah, C. Montagna, S. Parekh, A. Pellagatti, J. Boulwood, E. Paietta, R. P. Ketterling, L. Cripe, H. F. Fernandez, P. L. Greenberg, M. S. Tallman, C. Steidl, C. S. Mitsiades, A. Verma, and U. Steidl. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood*, 120(6):1290–1298, Aug 2012.

- [15] M. Katoh. Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br. J. Cancer*, 109(2):299–306, Jul 2013.