

Université de Montréal

**Étude des mécanismes moléculaires impliquant l'homéoprotéine MEIS1
dans le développement de leucémies myéloïdes aigües**

Par

Richard Bisailon

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de médecine

*Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en biologie moléculaire*

Avril 2014

© *Richard Bisailon, 2014*

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée:

**Étude des mécanismes moléculaires impliquant l'homéoprotéine MEIS1
dans le développement de leucémies myéloïdes aigües**

présentée par:

Richard Bisailon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Marie Kmita, Présidente-rapporteuse
Guy Sauvageau, Directeur de recherche
Éric Rassart, Membre du jury
Wilson H. Miller, Examineur externe
Alain Verreault, Représentant du doyen

RÉSUMÉ

Les leucémies myéloïdes aigües résultent d'un dérèglement du processus de l'hématopoïèse et regroupent des maladies hétérogènes qui présentent des profils cliniques et génétiques variés. La compréhension des processus cellulaires responsables de l'initiation et du maintien de ces cancers permettrait de développer des outils thérapeutiques efficaces et ciblés. Au cours des dernières années, une quantité croissante d'anomalies génétiques reliées au développement de leucémies ont été corrélées à une expression anormale des gènes HOX et de leurs cofacteurs MEIS et PBX. Des modèles expérimentaux murins ont confirmé le rôle direct joué par ces protéines dans le développement de leucémies. En effet, la protéine MEIS1 collabore avec HOXA9 dans la leucémogénèse et requiert pour ce faire trois domaines distincts. Deux de ces domaines sont conservés chez PREP1, un membre de la même classe d'homéoprotéine que MEIS1.

En utilisant une approche de gain-de-fonction, j'ai confirmé l'importance du rôle joué par le domaine C-terminal de MEIS1 dans l'accélération des leucémies induites par HOXA9. J'ai également montré que l'activité de ce domaine était corrélée avec une signature transcriptionnelle associée à la prolifération cellulaire. J'ai ensuite réalisé un criblage à haut débit afin d'identifier des antagonistes de l'interaction MEIS-PBX, également essentielle à l'accélération des leucémies HOX. À cette fin, j'ai développé un essai de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) permettant de détecter la dimérisation MEIS-PBX dans les cellules vivantes. Plus de 115 000 composés chimiques ont été testés et suite à une confirmation par un essai orthogonal, une vingtaine de molécules ont été identifiées comme inhibiteurs potentiels. Ces composés pourront être rapidement testés sur la prolifération de cellules leucémiques primaires dans un contexte d'étude préclinique. Finalement, deux approches protéomiques complémentaires ont permis d'identifier des partenaires potentiels de MEIS1 et PREP1. La catégorisation fonctionnelle de ces candidats suggère un nouveau rôle pour ces homéoprotéines dans l'épissage de l'ARN et dans la reconnaissance de l'ADN méthylé.

Mots-clés : Leucémies myéloïdes aigües, homéoprotéines HOX/MEIS/PBX, étude fonctionnelle, BRET, transcriptome, protéome, criblage à haut débit

ABSTRACT

Acute myeloid leukemias are the result of a perturbed hematopoietic process and regroup heterogeneous diseases with distinct clinical and genetic profiles. Identifying and understanding the faulty cellular processes would allow the development of targeted and efficient therapeutic tools. Over the last 15 years, a growing number of disease-linked genetic anomalies have been correlated with abnormal expression levels of HOX genes and their cofactors MEIS and PBX.

Mouse model experimentations revealed a direct role for these proteins in leukemogenesis. Indeed, the protein MEIS1 collaborates with HOXA9 in the acceleration of leukemia development. This specific function requires the presence of three different domains, two of which are highly conserved in PREP1, another member of the MEIS class of homeoproteins. Using a gain-of-function approach, I confirmed the importance of the C-terminal domain of MEIS1 in the acceleration of HOXA9-induced leukemias. I also correlated the activity of this domain with a transcriptional signature related to cell proliferation. Furthermore, I performed a high-throughput screen to identify antagonists of the MEIS-PBX interaction, also required for acceleration of HOX-induced leukemogenesis. In this regard I developed an assay that exploits bioluminescence resonance energy transfer (BRET) to monitor the MEIS-PBX dimerization in living cells. More than 115 000 compounds were tested and upon confirmation of their activity using an orthogonal assay, 20 small molecules were identified as potential inhibitors. These compounds will be rapidly tested on proliferation of primary leukemic cells in a preclinical setting. Finally two complementary proteomic approaches allowed the identification of new potential partners of MEIS1 and PREP1. The functional clustering of these candidates suggests a new role for homeoproteins in mRNA splicing and methylated DNA recognition.

Keywords: Acute myeloid leukemias, homeoproteins HOX/MEIS/PBX, functional study, BRET, transcriptome, proteome, high-throughput screening

Table des matières

RÉSUMÉiii
ABSTRACTiv
Table des matières	v
Liste des figuresix
Liste des tableauxxi
Liste des abréviations	xii
Remerciementsxvii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 Les leucémies myéloïdes aigües	1
1.1.1 Mise en contexte et définitions	1
1.1.2 Classification des LMA	3
1.1.2.1 French-American-British (FAB)	3
1.1.2.2 World Health Organization (WHO).	3
1.1.3 Pronostic des LMA	4
1.1.3.1 ELN (European Leukemia Net).	4
1.1.3.2 Signature transcriptionnelle leucémique	5
1.1.4 Apport du séquençage à haut débit	5
1.1.5 Cellules souches leucémiques	6
1.1.5.1 Hiérarchie et potentiel.	6
1.1.5.2 Thérapie et mécanisme	7
1.1.6 Évaluation fonctionnelle des cellules leucémiques	7
1.2 Les homéoprotéines	9
1.2.1 Introduction	9
1.2.2 L’homéodomaine	9
1.2.3 La superclasse ANTENNAPEDIA	10
1.2.3.1 Architecture	10
1.2.3.2 Fonction et régulation	11
1.2.3.3 HOX lors de l’hématopoïèse	12
1.2.3.4 Spécificité des sites de liaison des HOX	12
1.2.4 La superclasse des TALE	13
1.2.4.1 Classe PBC	13

1.2.4.2 Classe MEIS.14
1.2.5 Fonctions des homéoprotéines lors de l'hématopoïèse normale16
1.2.5.1 Superclasse Antennapedia.16
1.2.5.2 Classe des PBC17
1.2.5.2.1 PBX117
1.2.5.2.2 PBX2 et PBX318
1.2.5.3 MEIS119
1.2.5.4 PREP1.21
1.2.6 Incidence de la signature HOX/MEIS/PBX dans les leucémies humaines23
1.2.6.1 KMT2A (MLL)25
1.2.6.2 NUP98.27
1.2.6.3 NPM1c28
1.2.6.4 Translocations PICALM-MLLT10 et KAT6A-CREBBP29
1.2.6.5 Leucémies à faibles niveaux de HOX30
1.2.7 Rôle des HOX et TALE dans le développement de leucémies30
1.2.7.1 Études de gain de fonction30
1.2.7.1.1 HOX et MEIS30
1.2.7.1.2 Translocations impliquant les homéoprotéines.31
1.2.7.2 Études de perte de fonction32
1.2.8 Dynamique des interactions TALE-HOX34
1.2.8.1 Structure des interactions HOX-TALE34
1.2.8.1.1 Hétérodimère HOX-PBX34
1.2.8.1.2 Hétérodimère HOX-MEIS/PREP36
1.2.8.1.3 Hétérodimère PBX-MEIS/PREP.36
1.2.8.1.4 Hétérotrimère HOX-PBX-MEIS/PREP37
1.2.8.1.5 Homodimère PBX-PBX37
1.2.8.2 Fonctions des interactions HOX-TALE et TALE-TALE38
1.2.8.2.1 Régulation de la localisation nucléaire de PBX38
1.2.8.2.2 Modification de la chromatine39
1.2.8.2.3 Régulation de gènes cibles39
1.2.9 Domaines de MEIS1 importants pour la transformation40
1.3 Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)42

1.3.1	Prérequis techniques pour un RET.42
1.3.2	Applications biotechnologiques42
	CHAPITRE 2. C-terminal domain of MEIS1 converts PKNOX1 (PREP1) into a HOXA9-	
	collaborating oncoprotein46
2.1	Contribution des co-auteurs47
2.2	Résumé48
2.3	Summary49
2.4	Introduction.50
2.5	Material and methods.52
2.6	Results55
2.7	Discussion59
2.8	Tableau61
2.9	Figures62
2.10	Supplementary material71
2.11	Acknowledgements78
2.12	References.79
	CHAPITRE 3. Development of a novel BRET-based assay to characterize the leukemic	
	MEIS-PBX heterodimerization in living cells83
3.1	Contribution des co-auteurs84
3.2	Résumé85
3.3	Summary86
3.4	Introduction.87
3.5	Material and methods.89
3.6	Results93
3.7	Discussion99
3.8	Figures	102
3.9	Supplementary material	111
3.10	Acknowledgements	115
3.11	References.	116
	CHAPITRE 4. Mapping the interactome of MEIS1 and PKNOX1 TALE homeoproteins	
	reveals potential functions in mRNA splicing and epigenetic signaling	122
4.1	Contribution des co-auteurs	123

4.2 Résumé	124
4.3 Summary	125
4.4 Introduction.	126
4.5 Material and methods.	129
4.6 Results	131
4.7 Discussion	135
4.8 Tableau	139
4.9 Figures	141
4.10 Supplementary material	149
4.11 Acknowledgements	151
4.12 References.	152
CHAPITRE 5. DISCUSSION	159
5.1 Fonctions de MEIS et PREP dans la leucémie myéloïde aigüe	159
5.1.1 Fonction de transactivation	159
5.1.2 Gènes cibles	161
5.2 Du BRET aux leucémies	163
5.2.1 Inhibiteurs de MEIS-PBX	163
5.2.2 Spécificité des interactions TALE-TALE	164
5.3 Nouvelles fonctions pour les homéoprotéines	165
5.4 Conclusion	166
Bibliographie.	167

Liste des figures

Figure 1.1 Hiérarchie du système hématopoïétique.	2
Figure 1.2 Essai de reconstitution hématopoïétique.	8
Figure 1.3 Complexe des gènes HOX.	11
Figure 1.4 Structure des protéines KMT2A et NUP98.	26
Figure 1.5 Interaction HOX-TALE.	35
Figure 1.6 Illustration schématique décrivant le principe du BRET.	44
Figure 2.1 Structural and biochemical properties of wild type and mutant PKNOX1 proteins.	62
Figure 2.2 Identification of the <i>Pknox1</i> -mutants capable of accelerating <i>Hoxa9</i> -induced leukemia development.	64
Figure 2.3 Leukemias comprise the wild type and mutant <i>Pknox1</i> -transduced cells.	65
Figure 2.4 Morphological characterization of leukemias.	67
Figure 2.5 Impact of <i>Pknox1-MC</i> , <i>Meis1</i> and <i>Pknox1</i> expression on global gene expression profile of <i>Hoxa9</i> -transduced cells.	68
Figure 2.6 Comparison between datasets representing genes up-regulated in cells expressing <i>Hoxa9+Meis1</i> and <i>Hoxa9+Pknox1-MC</i>	70
Figure S2.1 Subcellular localization of HA-tagged PBX1A co-expressed with FLAG-tagged <i>Pknox1</i> -mutants.	71
Figure S2.2 Identification of the unique MEIS1 or PKNOX1 associated perturbations in gene expression.	73
Figure 3.1 HOX/PBX/MEIS signature is prevalent in CN-AML and correlates with overall survival.	102
Figure 3.2 Coordinated expression of HOX/PBX/MEIS genes in CN-AML.	104
Figure 3.3 LUC-MEIS1 and GFP-PBX1 biosensors are functionally active and maintain the molecular function of their wild-type counterparts.	105
Figure 3.4 Identification of critical residues for MEIS1-PBX1 heterodimerization using the highly specific MEIS-PBX BRET-based assay.	107
Figure 3.5 High-throughput screen and LUMIER validation assay.	109
Figure S3.1 HOX gene expression variability within CN-AML cohort.	111
Figure S3.2 LUC and GFP generates higher BRET signal when fused N-terminally to MEIS1 and PBX1, respectively.	112

Figure S3.3 BRET ratio is highly stable over time. 113

Figure S3.4 DMSO does not affect MEIS1-PBX1 BRET ratio output. 114

Figure 4.1 TALE CTD – GAL4 DBD constructs exhibit weak autonomous transactivation activity. 141

Figure 4.2 Screening of hematopoietic cDNA library reveals dramatic difference of resistant clones with MCT compared to PCT. 142

Figure 4.3 Yeast genetic validation of TALE-interacting candidates. 144

Figure 4.4 Confirmation of PPI between TALE CTDs and a subset of candidates in a mammalian expression system. 145

Figure 4.5 Stable clones express engineered PAPC-tagged TALE homeoproteins. 146

Figure 4.6 Large-scale complex purification of TALE protein partners uncovers common and new cellular functions. 147

Figure S4.1 Expression of selective nutritional reporter genes. 149

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Anomalies génétiques menant à une dérégulation HOX/MEIS/PBX	24
Tableau 2.1 Characteristics of AML from recipient mice	61
Tableau S2.1 Experimental details of the bone marrow reconstitution assay.	75
Tableau S2.2 Genes uniquely and commonly upregulated by TALE factors	76
Tableau S2.3 Genes uniquely and commonly downregulated by TALE factors	77
Tableau 4.1 Candidates interacting with TALE proteins identified by mass spectrometry . .	139
Tableau S4.1 Functional GO term enrichment	150

Liste des abréviations

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazole, compétiteur du gène HIS3
5-FU	5-Fluorouracile
Å	Unité de mesure Angstrom
A (ALA)	Alanine
Ac	Groupement acétyle
AD	Domaine d'activation de la transcription
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH109	Souche de levure
ANT-C	Complexe Antennapedia
ARN	Acide ribonucléique
AT-Hook	Domaine de liaison à l'ADN
bHLH	Facteur de transcription avec un motif hélice-boucle-hélice basique
BiFC	Biomolecular fluorescence complementation
BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
BX-C	Complexe Bithorax
BXH-2	Lignée de souris développant spontanément des leucémies
CBF	Facteur de transcription hétérodimérique
CCAC	Conseil Canadien sur les soins des animaux
CDEA	Comité de déontologie en expérimentation animale
cDNA	ADN complémentaire
YFP/GFP	Protéine fluorescente jaune/verte
CFU	Unité de formation de colonie
ChIP-seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivi par séquençage à haut débit
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CN	Caryotype normal
CpG	Dinucléotide cytosine-guanine
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSH-CT	Cellule souche hématopoïétique court-terme
CSH-LT	Cellule souche hématopoïétique long-terme

CSL	Cellule souche leucémique
CTD	Domaine C-terminal
CxxC	Domaine reconnaissant les îlots CpG méthylés
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DBD	Domaine de liaison à l'ADN de GAL4
E15.5	Jour embryonnaire 15.5
EAP	Complexe associé à l'élongation transcriptionnelle
ELN	European Leukemia Net
F (PHE)	Phénylalanine
FAB	Classification French American British
FRET	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
G (GLY)	Glycine
GEMM	Colonie avec potentiel granulo-erythro-mono-megacaryocytaire
GMP	Précurseur granulo-monocytaire
GO	Ontologie de gènes
GST	Glutathione S-transférase
H3/H4	Histone H3 / Histone H4
HAT	Activité d'acétylation d'histone
HD	Homéodomaine
HDAC	Histone déacétylase
HM	Domaine Homothorax-MEIS
HOM-C	Complexe homéotique
HOX	Gène à homéobox
I (Ile)	Isoleucine
inv()	Inversion chromosomique
IPP	Interaction protéine-protéine
K	Lysine
KMT2A	Lysine méthyltransférase
L (LEU)	Leucine
LLA	Leucémie lymphoblastique aigüe
LMA	Leucémie myéloïde aigüe
LMC	Leucémie myéloïde chronique

lncRNA	Long ARN non codant
M33	Domaine de répression
MCT	Domaine C-terminal de MEIS1
me	Groupement méthyle
MEIS	Classe de d'homéoprotéine TALE hétérodimérisant avec PBX
MEP	Précurseur mégacaryo-erythrocytaire
MRD	Maladie résiduelle minimale
μRNA	micro-ARN
MSCV	Virus de cellule souche murin
MYH	Chaîne lourde de myosine
N (ASN)	Asparagine
NAC	N-Acetylcystéine
NMR	Résonance magnétique nucléaire
NPM1	Nucléophosmine
NPM1c	Nucléophosmine cytoplasmique
PBC	Domaine protéique caractérisant cette classe d'homéoprotéine
PBX	Facteur de transcription de leucémie Pré-B avec homéobox
PcG	Complexe répresseur de remodelage de la chromatine
PCT	Domaine C-terminal de PREP1
PHD	Domaine homeobox de plante
PIM	Motif d'interaction avec PBX
PREP	Protéine hétérodimérisant avec PBX
PYP	Proline-Tyrosine-Proline
R (ARG)	Arginine
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RET	Transfert d'énergie de résonance
RLUC	Luciférase de Renilla
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
RPKM	Unité de mesure normalisé des lectures de séquençage à haut débit
SD	Milieu synthétique défini minimal
SEC	Complexe favorisant l'élongation transcriptionnelle
SEN	Signal d'exportation nucléaire

SET	Domaine Su(var)3-9 and 'Enhancer of zeste'
SFP	Sans pathogène spécifique
SHD	Séquençage à haut débit
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux
SLN	Signal de localisation nucléaire
SMC	Protéine du complexe des cohésines
SMD	Syndrome myélodysplasique
SWI/SNF	Complexe de remodelage de la chromatine
t(;)	Translocation chromosomique
TALE	Superfamille d'homéoprotéine avec une boucle de 3 acides aminés
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	Récepteur des cellules T
TSA	Trichostatin A
TSS	Site d'initiation de la transcription
VP16	Domaine de transactivation
W (TRP)	Tryptophane
WHO	Classification World Health Organization
Y187	Souche de levure

À Robert Drouin

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Guy Sauvageau pour la passion, la connaissance, la liberté et la guidance. Un immense merci aux membres et amis du laboratoire, présents, passés et celle qui n'est plus. Pour votre amour, votre humour, votre support et vos connaissances. Une mention spéciale à Jana, Simon, Nadine, Jalila et Suzanne.

Merci aux membres du jury pour la révision de ma thèse de doctorat en vue d'en faire un travail de meilleure qualité. Merci aux patients ainsi qu'aux organismes subventionnaires (Instituts de Recherche en Santé du Canada, Fondation Cole et l'Université de Montréal).

Merci à ma fiancée Catherine et à nos familles, pour tout. Merci à mes amis, pour le reste.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Les leucémies myéloïdes aigües

1.1.1 Mise en contexte et définitions

On recense annuellement au Canada près de 1200 nouveaux cas de leucémies myéloïdes aigües (LMA). Cinq ans suivant la prise en charge thérapeutique, seulement 20% de ces patients ne présenteront aucun symptôme résiduel (stade de rémission), faisant de la LMA l'un des cancers les plus meurtriers (<http://www.cancer.ca>).¹ Conceptuellement la maladie se définit par la perturbation de deux fondements généraux du système hématopoïétique. Les cellules affectées cessent d'abord de se différencier en cellules plus matures. Il en résulte une cytopénie, ou diminution de la cellularité, affectant les lignées cellulaires plus spécialisées situées en aval dans l'arbre hématopoïétique (**Figure 1.1**). On note également une augmentation du potentiel prolifératif qui conduira conséquemment à une accumulation de cellules immatures du sang étant incapables d'exercer leurs fonctions au sein de l'organisme. Ces déviations cellulaires surviendront suite à l'accumulation de mutations qui affectent des éléments génétiques impliqués dans l'accomplissement de ces fonctions.

Les LMA ont en commun l'accumulation de cellules immatures engagées dans la voie de différenciation myéloïde, qui est responsable entre autres de la production des mégacaryocytes, plaquettes, érythrocytes, granulocytes de même que les monocytes/ macrophages (**Figure 1.1**). Mais bien qu'elles soient désignées par le même nom, elles représentent en réalité plusieurs maladies hétérogènes qui varient au niveau de la présentation des symptômes, de la morphologie des cellules affectées, de l'immunophénotype de même qu'au niveau des altérations génétiques acquises. En effet un complexe réseau de cascades transcriptionnelles et signalétiques régule le destin cellulaire hématopoïétique et la perturbation de l'une de ces composantes peut engendrer des conséquences sur un ou plusieurs types cellulaires particuliers.² Pour cette raison, certaines leucémies myéloïdes présentent parfois des caractéristiques morphologiques ou phénotypiques identiques et ce, même si elles ne sont pas atteintes des mêmes mutations. Ces distinctions permettent également d'expliquer rétrospectivement les réponses distinctes aux traitements observées pour des leucémies à morphologie identique.

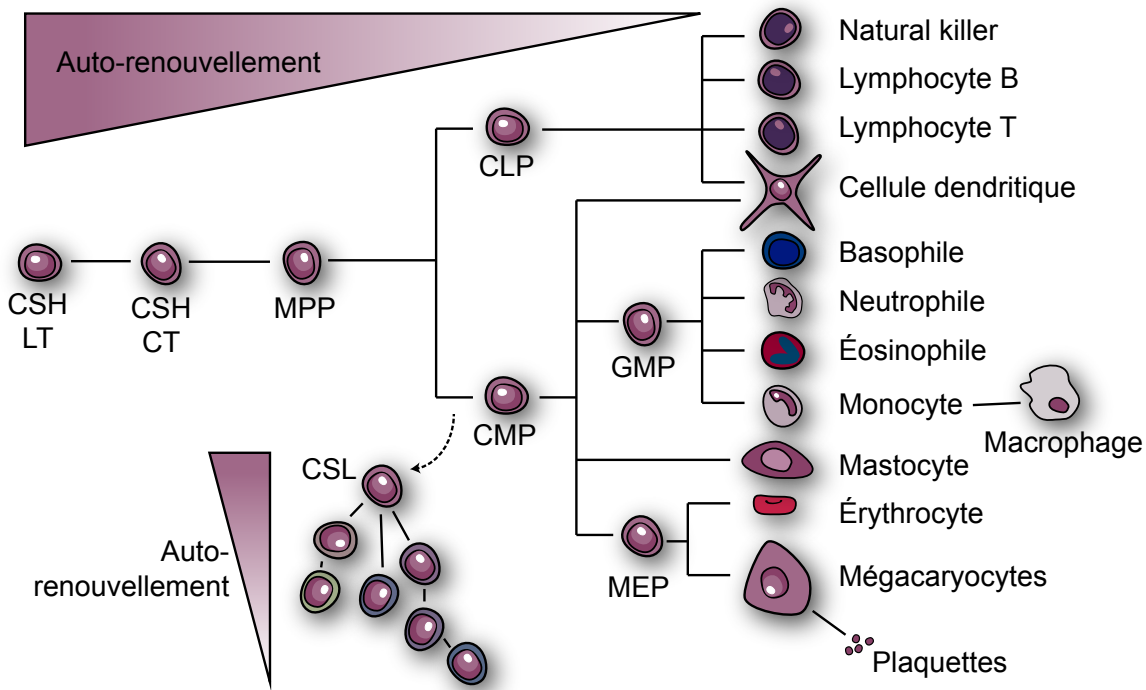


Figure 1.1 Hiérarchie du système hématopoïétique.

Les cellules souches hématopoïétiques (à gauche) se différencient en toutes les lignées de l'arbre hématopoïétique et perdent graduellement leur potentiel d'auto-renouvellement. La flèche pointillée près du CMP indique l'acquisition de mutations qui mène au développement d'une leucémie myéloïde aigüe. CSH-LT: Cellules souches hématopoïétiques avec potentiel de reconstitution à long-terme. CSH-CT: Cellules souches hématopoïétiques avec potentiel de reconstitution à court-terme. MPP: Progéniteur multipotent. CLP: Progéniteur commun lymphoïde. CMP: Progéniteur commun myéloïde. MEP: précurseur mégacaryo-érythrocytaire. GMP: Précurseur granulo-monocytaire. CSL: Cellule souche leucémique.

Avec l'avancement des technologies, il devint graduellement possible d'incorporer certains éléments génétiques à la trousse d'outils diagnostiques des spécialistes. On remarqua par exemple, la présence récurrente de certaines anomalies chromosomiques résultant en la production de protéines de fusion aberrantes. La caractérisation fonctionnelle du produit protéique de ces translocations permit dans certains cas de développer un traitement spécifique capable de cibler précisément la population de cellules transformées. On note à titre d'exemples la tréti-noïne forçant la différenciation des leucémies promyélocyaires contenant la translocation

PML-RARA de même que l'inhibiteur imatinib qui cible l'activité kinase de BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC).³ Le raffinement subséquent des systèmes de classification faisant intervenir l'ensemble des caractéristiques morphologiques, phénotypiques et génétiques a permis une meilleure appréciation des différents sous-types de LMA et contribua à améliorer sensiblement les réponses thérapeutiques, malgré que la nature des traitements, sauf exceptions, ait peu évolué au cours des 30 dernières années.⁴ J'aborderai ci-dessous l'évolution de ces systèmes de classification en m'attardant davantage sur les récentes additions.

1.1.2 Classification des LMA

1.1.2.1 French-American-British (FAB)

La FAB fut adoptée en 1976 et se voulait un système de classification permettant l'uniformisation de la nomenclature et facilitant le suivi des cas cliniques. Elle regroupait les LMA en 6 catégories distinctes basées uniquement sur les critères morphologiques.⁵ Elle en compte aujourd'hui 8, de M0 à M7, correspondant au stade de différenciation apparent des cellules le long de l'arbre hématopoïétique (immature → mature). Malgré qu'elle représente un outil diagnostique imprécis ayant souvent mené à des sous- et des sur-traitements, sa base solide et son accessibilité permettent qu'elle soit toujours employée aujourd'hui. Elle est d'ailleurs partiellement incorporée à la WHO.

1.1.2.2 World Health Organization (WHO)

La classification WHO a été adoptée en 2002 avec pour objectif de compléter la FAB à l'aide de données cliniques et biologiques additionnelles.⁶ Elle intègre les événements cytogénétiques récurrents et l'immunophénotype des cellules leucémiques avec l'historique du patient dans un système de stratification de risque. En considérant ces données supplémentaires, la classification devient du même coup légèrement moins subjective. Les LMA y sont regroupées en 4 catégories : 1) Avec translocation chromosomique récurrente; 2) Avec dysplasie multilignée; 3) Associées à un traitement antérieur; et 4) Non-classifiables. Les translocations chromosomiques de la première catégorie ont été rassemblées sur la base de leur correspondance avec la morphologie des cellules leucémiques en plus de leur association, en général, à un pronostic particulièrement favorable. Ces translocations incluent les « Core Binding Factors » (CBF) RUNX1-RUNX1T1 et CBFβ-MYH11 ainsi que PML-RARA et les translocations KMT2A. Ces dernières sont d'ailleurs très variées et ne sont pas toujours associées à un bon pronostic.

Ensemble, ces translocations sont présentes dans environ 30% des cas de LMA.⁶ La seconde catégorie est caractérisée par la présence d'une dysplasie (accumulation de blastes non-terminalement différenciés) affectant 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes différentes. Elles peuvent se développer suite à une progression de syndrome myélodysplasique (SMD) ou survenir *de novo*.⁷ Le troisième groupe quant à lui est constitué de LMA s'étant développées suite à l'exposition à un agent chimique (inhibiteurs de Topoisomérase II ou agent alkylant, par exemple) et/ou aux radiations lors d'une thérapie antérieure. Leur pronostic est généralement défavorable.⁸ Finalement, la dernière catégorie comprend des leucémies qui ne correspondent à aucun des 3 groupes précédents. On les regroupe donc, à quelques différences près, selon les mêmes critères de la FAB.

En somme, ce système effectue un premier pas vers l'incorporation des données génétiques dans la classification des LMA. Malheureusement, la grande majorité des leucémies n'avaient encore que la morphologie comme facteur distinctif. En ce sens, il est maintenant connu qu'environ 50% des LMA présentent un caryotype normal (CN-LMA) et répondent de manière variable aux traitements, soulignant le besoin pressant de développer une classification plus complète et plus discriminante. L'autre 50% a déjà été associé à près de 300 translocations différentes, dont certaines extrêmement rares.⁹ Cette observation souligne un autre besoin d'analyser de manière concomitante de larges cohortes afin de pouvoir établir des corrélations solides. Le programme ELN décrit ci-dessous a tenté de répondre à certains de ces besoins.

1.1.3 Pronostic des LMA

1.1.3.1 ELN (European Leukemia Net)

L'initiative ELN est un consortium de laboratoires diagnostiques misant sur la standardisation des procédés et sur le partage de données. Elle promeut une approche intégrative des différents champs d'expertise diagnostique (morphologie, caryotype, génomique et transcriptomique) dans le but de développer, notamment, des outils pronostiques robustes. Ils ont récemment analysé une cohorte de plus de 1500 patients et sont arrivés à une nouvelle échelle de risque basée sur les caryotypes et la présence de mutations dans 3 gènes : *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA*. Cette échelle définit actuellement 4 groupes de risques: 1) Favorable, qui comprend les CBF, les CN-LMA mutés dans *NPM1* mais non dans *FLT3* ainsi que les *CEBPA* mutés; 2) Intermédiaire I, qui regroupe les CN-LMA qui ne sont pas incluses dans le groupe 1; 3) Intermédiaire II, qui com-

prend la translocation KMT2A-MLLT3 ainsi que les translocations qui ne sont ni favorables ou défavorables; et 4) Défavorable, qui regroupe les autres translocations KMT2A, DEK-NUP214, RPN-MECOM, les délétions des chromosomes 5 et 7 de même que les caryotypes complexes.¹⁰ Une étude subséquente répéta l'exercice avec de nouvelles mutations et révéla le pronostic défavorable également corrélé avec les mutations dans *TP53*, *RUNX1* et *ASXL1* et *KMT2A*.¹¹

1.1.3.2 Signature transcriptionnelle leucémique

Il est également possible de générer une échelle de risques en évaluant les niveaux d'expression d'un groupe de gènes donnés. Plusieurs « signatures pronostiques » ont été rapportées et même si les résultats varient d'une étude à l'autre, certains gènes semblent se démarquer sur une base régulière tels que *ERG*, *MECOM*, *MNI*, *PBX3* et *BAALC*.¹²⁻¹⁶ L'intégration des propriétés morphologiques, génétiques et transcriptomiques permettra éventuellement le développement d'un système simple et performant capable de stratifier les leucémies et d'initier une prise en charge thérapeutique optimale et adaptée à chaque patient.

1.1.4 Apport du séquençage à haut débit

La technologie de séquençage à haut débit (SHD) développée au cours des dernières années a déjà transformé le domaine de la génomique du cancer. Dans une étude phare rapportée en 2008, on compara la séquence complète du génome d'un tissu sain et d'une CN-LMA dans le but d'identifier, à la paire de bases près, des événements moléculaires responsables de l'initiation de la maladie.¹⁷ Les chercheurs confirmèrent la présence de 2 mutations somatiques déjà connues dans *NPM1* et *FLT3* en plus d'en identifier de nouvelles dans 8 gènes supplémentaires. Leurs travaux subséquents menèrent à la découverte de mutations dans les gènes *IDH1* et *DNMT3A*,^{18,19} dont l'incidence est aujourd'hui évaluée à environ 25% des LMA et qui en fait l'un des gènes le plus fréquemment muté. L'ensemble de ces travaux renforce la pertinence de cette puissante technologie dans l'analyse génétique des syndromes hématopoïétiques.

Un effort massif de SHD sur 50 génomes complets et 150 exomes de LMA par le consortium The Cancer Genome Atlas (TCGA) mena à l'identification de plus de 2000 mutations somatiques qui furent ensuite catégorisées en 4 classes selon leur localisation dans des régions codantes, régulatrices, non-répétitives ou non-conservées. Le regroupement des mutations non-synonymes de la première classe selon leur fonction biologique suggéra un impact sur 6 réseaux fonctionnels distincts (suppression de tumeur, méthylation de l'ADN, épissage de l'ARN, si-

gnalisation, modification de la chromatine et complexe des cohésines) auxquels peuvent s'ajouter 3 groupes fonctionnels déjà reconnus dans la pathogenèse (NPM1, facteurs de transcription myéloïde et fusions de facteur de transcription). Les auteurs confirmèrent ensuite que chacun des 200 génomes analysés contenait une mutation dans au moins un de ces 9 réseaux fonctionnels et que ces dernières au sein de chaque réseau étaient souvent mutuellement exclusives. Cette observation suggère que la perturbation d'un groupe fonctionnel par une seule mutation clé est suffisante pour contribuer à la leucémogenèse.²⁰ Ces résultats pointent vers une pathogenèse conservée au sein d'un groupe hétérogène de LMA et permettent de dresser un portrait fonctionnel plus complet de ces cancers à partir de leur profil mutationnel.

La validation fonctionnelle de ces mutations dans le développement de cancer est déjà bien entamée. Il fut établi par exemple que certaines d'entre elles altéraient le patron de méthylation de l'ADN sur de grandes régions inter- et intra-géniques, une marque épigénétique récemment associée à la chromatine permissive.²¹ De plus, les mutations identifiées dans la machinerie d'épissage tendent à cibler les sous-unités impliquées dans l'initiation et la reconnaissance des ARNm et suggèrent un défaut dans la production d'ARN matures correctement épissés. En ce sens, la comparaison des transcriptomes de patients avec des mutations U2AF1 et SF3B1 démontra, respectivement, une augmentation des omissions et des rétentions d'exons.^{22,23} Le rôle d'une inactivation fonctionnelle des cohésines dans la leucémogenèse n'a toutefois pas encore été étudié. En somme, ces études contribuèrent à un avancement accéléré des connaissances relatives à la pathogenèse des cancers du sang et promettent de dresser un portrait encore plus détaillé avec, entre autres, l'analyse des longs ARN non-codants (lncRNA) et de l'évolution des sous-clones leucémiques.^{24,25} De plus, l'intégration de ces nouveaux mécanismes permettra éventuellement de générer une puissante plateforme diagnostique.

1.1.5 Cellules souches leucémiques

1.1.5.1 Hiérarchie et potentiel

Une étude majeure effectuée au Canada par le Dr John Dick montra que les cellules de LMA ne possédaient pas toutes le même potentiel de régénération tumorale lorsque transplantées dans des souris hôtes.²⁶ Ces travaux s'inscrivent dans l'élaboration du concept de « cellules souches leucémiques » (CSL). Une cellule souche hématopoïétique (CSH) est une cellule progénitrice multipotente (MPP) capable de s'auto-renouveler ainsi que de générer des cellules-filles qui se différencieront en toutes les lignées cellulaires du système hématopoïétique (**Figure 1.1**). Une

CSL démontrerait sensiblement les mêmes propriétés qu'une CSH, assurant le maintien et la croissance des populations cellulaires hétérogènes qui constituent le cancer.²⁷ Elles se définissent fonctionnellement par leur capacité à initier et soutenir le développement de leucémies dans des souris hôtes.

Conceptuellement, il est raisonnable de croire que les cellules immatures hématopoïétiques représentent des cibles toutes désignées pour l'accumulation de mutations menant à une transformation maligne. Effectivement, ces cellules subsistent sur une très longue période au sein de l'organisme et exploitent déjà un programme établi d'auto-renouvellement. En ce sens, il a été montré que certains oncogènes perdent leur potentiel transformant dans des populations de cellules qui ont dépassé un stade de maturation donné.²⁸ De plus, les CSH localisent naturellement dans des régions de la moelle osseuse pauvres en oxygène permettant ainsi de limiter la production secondaire de ROS susceptible de causer des dommages à l'ADN.²⁹

1.1.5.2 Thérapie et mécanisme

Ces résultats ont un impact direct sur le succès des thérapies contre le cancer. Les CSL sont effectivement enrichies dans la population quiescente des cellules leucémiques (une autre caractéristique commune avec les CSH) et parviennent conséquemment à déjouer les traitements de chimiothérapie développés pour éliminer les cellules en prolifération.³⁰ Cette observation expliquerait le nombre élevé de rechutes par la persistance de ces CSL dans l'organisme, aussi connue sous le terme de maladie résiduelle minimale (MRD), et leur réactivation subséquente dans la vie du patient. À la lumière de ces résultats il importe de développer une stratégie pour les identifier et/ou les activer avant de les éradiquer. Une meilleure compréhension de la biologie des CSL nous est venue de leur comparaison directe avec les CSH. L'équipe du Dr John Dick a ainsi identifié une signature génétique des CSL isolées et caractérisées fonctionnellement. Ils ont rapporté une modulation de gènes caractéristiques des CSH supportant l'existence d'un programme d'auto-renouvellement partagé. Parmi ces gènes on remarque notamment *ERG*, *MEIS1*, *MECOM*, *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXA5*, *FLT3* et *BAALC*, des facteurs déjà intimement liés à l'hématopoïèse et au développement de leucémies.³¹ Une difficulté inhérente à ce type de comparaison réside toutefois dans l'impossibilité de reproduire exactement la niche des CSH/CSL humaine à partir de modèles expérimentaux murins, aussi sophistiqués soient-ils.

1.1.6 Évaluation fonctionnelle des cellules leucémiques

L'étude des cellules hématopoïétiques consiste typiquement en un traitement ou une altération génétique d'une population de cellules d'intérêt avant d'en évaluer les effets à partir d'essais *in vitro* ou *in vivo*. La capacité intrinsèque des cellules hématopoïétiques à retourner du sang à la

moelle osseuse facilite grandement l'évaluation des propriétés cellulaires *in vivo* et représente la base de l'essai de reconstitution hématopoïétique.³² Un exemple typique de l'évaluation des propriétés transformantes d'un oncogène est illustré à la **Figure 1.2** et illustre une expérience rapportée dans le Chapitre 2. Brièvement, les cellules hématopoïétiques sont extraites de la moelle osseuse de souris préalablement traitées au 5-fluorouracile (5-FU). Ce composé éliminera les cellules en prolifération, enrichissant du même coup pour les cellules immatures, et facilitera l'infection rétrovirale subséquente. Celle-ci transmettra l'ADN complémentaire (cDNA) d'intérêt ainsi qu'un gène rapporteur aux cellules en culture. Ces dernières seront finalement transplantées par voie intraveineuse dans des souris receveuses dont le système hématopoïétique a été préalablement détruit par irradiation.³³ Le greffon aura alors la tâche de reconstituer le système sanguin de la souris hôte. Il est également possible d'évaluer l'intégrité d'un compartiment de cellules progénitrices par des essais de formation de colonies *in vitro* sur un milieu semi-solide (CFU).

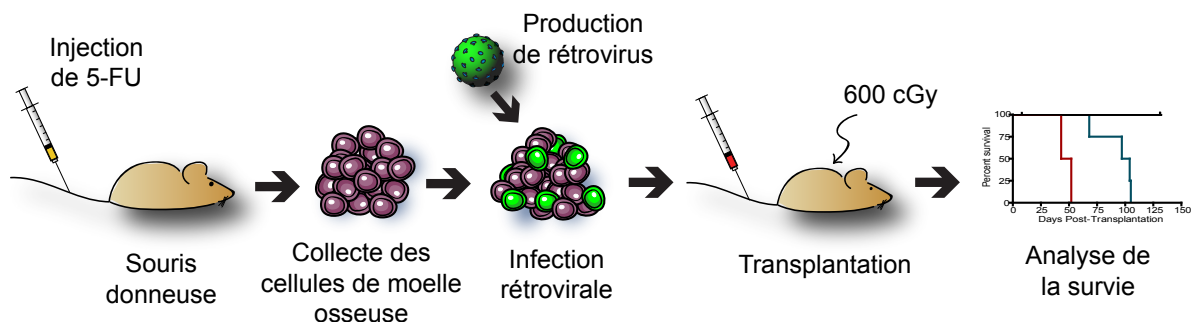


Figure 1.2 Essai de reconstitution hématopoïétique.

La population de cellules enrichies en progéniteurs suite à l'injection de 5-FU est récoltée puis infectée par rétrovirus avant d'être transplantée dans des souris hôtes irradiées. L'analyse de la reconstitution hématopoïétique se fait ensuite par saignée à différents temps. Si le gène exprimé de manière ectopique est un oncogène, il se peut que les souris développent des leucémies.

L'évaluation des propriétés des cellules leucémiques humaines a été grandement ralentie par l'incapacité de maintenir ces cellules *ex vivo* sans qu'elles ne se différencient ou meurent par apoptose. L'interprétation des manipulations génétiques ou de traitements *in vitro* devient alors impossible. L'alternative consiste à utiliser des lignées cellulaires leucémiques dérivées de patients. Malheureusement ces conditions ne parviennent pas à reproduire la complexité de l'or-

ganisation hiérarchique des cellules leucémiques. En ce sens, des travaux récents ont mené à la découverte d'une molécule chimique capable de maintenir et d'expandre certains échantillons leucémiques primaires *in vitro*.³⁴ Ces nouvelles conditions de culture, jumelées à l'optimisation constante des modèles de souris receveuses de xénogreffes, permettront le développement de cribles d'inhibiteurs ciblant spécifiquement les cellules leucémiques de même que l'évaluation du rôle des gènes « signatures » dans le développement et le maintien des LMA.

1.2 Les homéoprotéines

1.2.1 Introduction

En 1978, Edward B. Lewis rapporta une série de découvertes fascinantes dans un article de *Nature* qui établissait un principe de colinéarité entre la disposition de certains gènes au sein d'un chromosome et le patron d'expression correspondant dans les différents segments corporels de la drosophile.³⁵ À ces découvertes s'ajoutèrent rapidement des expérimentations génétiques qui permirent d'observer la transformation d'une partie segmentaire en une autre, phénomène connu sous l'expression « variation homéotique » (William Bateson, 1894), à la suite de la dérégulation de certains gènes.³⁶ Il fut établi que la drosophile possédait plusieurs de ces gènes homéotiques regroupés sur deux loci différents: le complexe Bithorax (BX-C) et le complexe Antennapedia (ANT-C), formant ensemble le complexe Homéotique (HOM-C). L'expansion rapide des outils génétiques permit de constater que ces gènes possédaient tous une séquence conservée de 180 paires de bases appelée homéobox, codant pour un domaine de liaison à l'ADN qu'on appelle aujourd'hui l'homéodomaine (HD).³⁷ Ces travaux pionniers ont valu à ces scientifiques le prix Nobel de médecine / physiologie en 1995.

1.2.2 L'homéodomaine

À ce jour, grâce à l'avancement des technologies génétiques, on recense des centaines de gènes homéobox chez les mammifères dont plusieurs sont impliqués dans le développement embryonnaire par l'entremise de mécanismes de régulation transcriptionnelle. Typiquement l'HD est constitué de 60 acides aminés qui se replie en formation de 3 hélices alpha, les deux premières étant reliées par une boucle tandis que les deux dernières sont associées selon une formation hélice-tour-hélice. Des études de cristallographie et résonance magnétique nucléaire ont révélé que la troisième hélice contactait le sillon majeur de l'ADN et permettait la reconnaissance

d'une séquence d'ADN spécifique tandis que la portion N-terminale de l'HD située en amont de la première hélice s'associait avec le sillon mineur.³⁸ Le seul résidu qui ne varie jamais de toutes les séquences HD (asparagine N51) est situé dans la troisième hélice et forme un lien hydrogène avec une adénine du sillon majeur.³⁹ La structure en trois hélices permet à la première d'aller contacter la troisième par une leucine (L) et un dipeptide tryptophane et phénylalanine (W-F), respectivement, extrêmement bien conservés.⁴⁰ Bien que la structure et la séquence de l'HD aient été bien préservées, on dénote tout de même quelques variations peptidiques récurrentes ainsi que la présence de domaines supplémentaires juxtaposant l'HD. En se basant sur ces particularités, les homéoprotéines seront hiérarchiquement regroupées en différentes « Superclasse », « Classe » et « Famille ». On dénote de manière non-exhaustive la présence des superclasses ANTENNAPEDIA, LIM,⁴¹ POU,⁴² TALE⁴³, PAIRED⁴⁴ et CUT.⁴⁵ Pour leur implication directe et bien documentée dans l'hématopoïèse et le développement de leucémies, seules les superclasses ANTENNAPEDIA et TALE seront abordées dans cette thèse.

1.2.3 La superclasse ANTENNAPEDIA

1.2.3.1 Architecture

Cette superclasse regroupe un grand nombre de gènes homéobox et inclue notamment la classe HOX, para-HOX, NKL et HOX « dispersés ». La classe des HOX est sans contredit la plus connue et la mieux caractérisée et correspond aux homologues des gènes HOM-C originellement identifiés chez la drosophile. Ces derniers, nommés dans l'ordre d'expression antéro → postérieure, sont *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *zerknüllt (zen)*, *deformed (dfd)*, *sex-combs-reduced (scr)*, *antennapedia (antp)*, *ultrabithorax (ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* et *abdominal-B (abd-B)*. Leur regroupement dans les complexes ANT et BX est illustré à la **Figure 1.3**. Les mammifères possèdent 39 gènes HOX, suite à un événement de duplication du complexe HOM survenue à deux reprises au cours de l'évolution des chordés,⁴⁶ assemblés en 4 séries de paralogues (HOXA, HOXB, HOXC et HOXD; paraglogue 1 à 13) et localisés sur 4 chromosomes différents (A: 7p15; B: 17q21; C:12q13 et D:2q31). Les correspondances homologiques sont illustrées à la **Figure 1.3**.

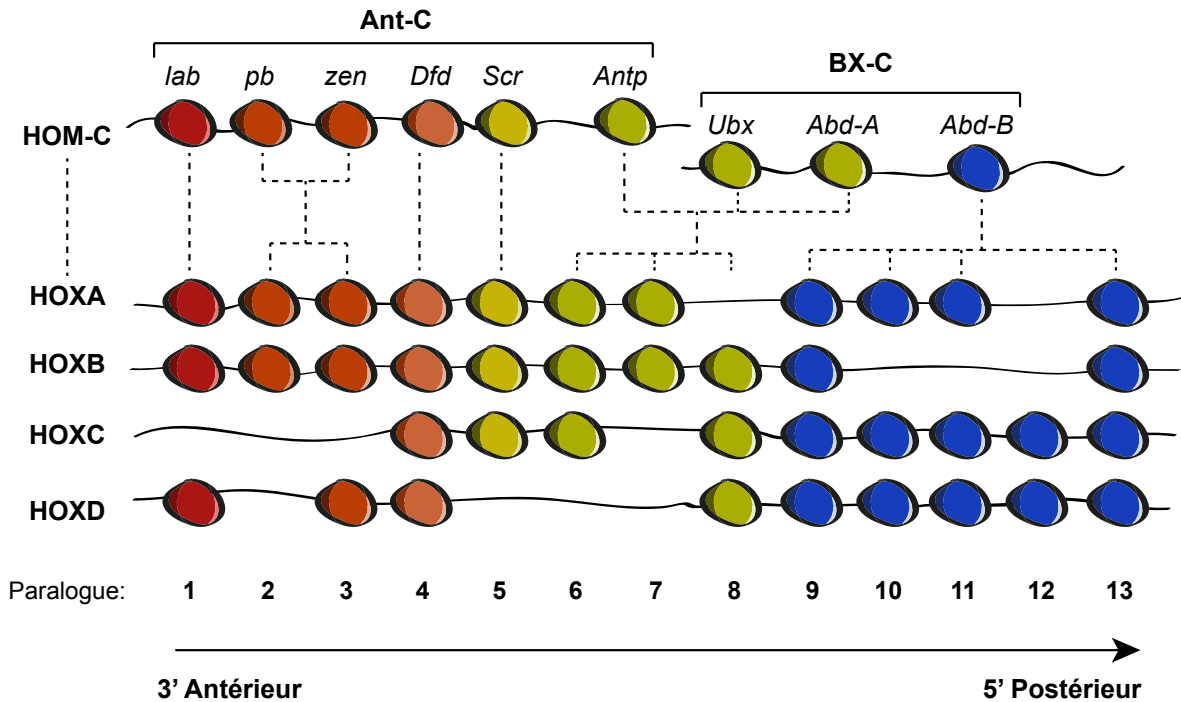


Figure 1.3 Complexe des gènes HOX.

Schéma illustrant les gènes du complexe HOM chez la drosophile qui ont dérivé et se sont dupliqués pour former les 4 groupements HOX (A-D) chez les mammifères. Le complexe HOM est constitué de deux groupements distincts appelés ANT-C (complexe antennapedia) et BX-C (complexe bithorax). Les lignes pointillées indiquent l'ancêtre probable basé sur les homologies de séquences. lab: labiale. pb: proboscipedia. zen: zerknüllt. Dfd: Deformed. Scr: Sex-Comb-Reduced. Antp: Antennapedia. ubx: ultrabithorax. Abd-A: Abdominal-A. Abd-B: Abdominal-B.

1.2.3.2 Fonction et régulation

Les HOX sont des maîtres régulateurs et participent à la spécification de l'identité cellulaire le long des axes corporels antéro-postérieur, dorso-ventral et proximo-distal.^{47,48} De plus ils exercent une influence sur le maintien de l'homéostasie des tissus adultes, comme le système hématopoïétique, et leur dérégulation peut mener au développement de cancer.⁴⁹ La régulation de l'expression des HOX au cours de l'embryogenèse selon le dogme de la colinéarité a longtemps prévalu. Il consiste en une expression spatio-temporelle des HOX dictée par leur position chromosomique respective, c'est-à-dire que les HOX 3' sont exprimés antérieurement et précocement par rapport aux 5', exprimés plus tard et dans les régions plus caudales. La quantité relative des HOX exprimés de manière chevauchante le long de cet axe déterminerait le destin

cellulaire. Une prévalence postérieure a également été observée et se définit par la dominance fonctionnelle d'un HOX postérieur sur un HOX antérieur, sans faire intervenir de régulation transcriptionnelle.⁵⁰

Ce modèle doit aujourd'hui composer avec une multitude de mécanismes supplémentaires de régulation. Brièvement, on note une variation des niveaux d'expression d'un sous-groupe de HOX associées à des μ RNA ou des lncRNA.⁵¹⁻⁵⁴ On rapporte également l'existence de multiples transcrits alternatifs de même qu'une sélectivité traductionnelle qui résulterait en une processivité inégale de certains transcrits HOX.⁵⁴⁻⁵⁸ De plus, les éléments de régulation *en cis* au sein de ces loci doivent être pris en considération. En effet, offrant davantage qu'une simple disposition linéaire, les séquences génomiques avoisinantes contiennent des éléments régulateurs comme des promoteurs partagés ou des amplificateurs distaux.^{59,60} Finalement on note un phénomène d'accessibilité nucléo-spatiale où des loci HOX sont relocalisés dans le noyau lors de leur activation, un processus accompagné d'un changement épigénétique d'une forme répressive (H3K27me3) à une forme ouverte (H3K4me3).²³ Ces divers mécanismes ne sont pas exclusifs et pourraient plutôt former une toile complexe de régulation offrant une flexibilité et une stabilité qui empêcherait les perturbations spatiales ou temporelles d'avoir un effet majeur sur l'identité cellulaire.

1.2.3.3 HOX lors de l'hématopoïèse

Tel que mentionné ci-haut les gènes HOX sont exprimés dans les cellules du système hématopoïétique.^{61,62} La vingtaine de HOX détectés dans les cellules humaines appartiennent aux groupements de paralogues A, B, et C, et leur niveau d'expression est proportionnel au potentiel d'auto-renouvellement des cellules, avec une certaine prévalence des HOX antérieurs dans le compartiment cellulaire le plus immature. Ces niveaux diminuent rapidement dès que s'enclenche le processus définitif de différenciation cellulaire.⁶³ Ces données suggèrent un rôle dans le maintien du potentiel d'auto-renouvellement des cellules immatures. Leur fonction précise dans le processus hématopoïétique et les conséquences de leur dérégulation dans le développement de leucémies seront abordées dans les sections ci-dessous.

1.2.3.4 Spécificité des sites de liaison des HOX

L'homéodomaine des HOX étant bien conservé, on a remarqué une faible spécificité des sites d'ADN liés. Effectivement, des techniques de retards sur gel permirent d'identifier une séquence consensus comparable de 4 nucléotides entre chaque HOX, ressemblant à TAAT ou

TTAT.⁶⁴ Cette préférence générique fut longtemps difficile à réconcilier avec leurs spécificités fonctionnelles. Il fut révélé par la suite que les HOX liaient l'ADN avec différents cofacteurs et que ces interactions augmentaient dans certains cas la spécificité du site d'ADN contacté.³⁹ Ces cofacteurs sont des protéines de la superclasse des TALE.

1.2.4 La superclasse des TALE

Cette superclasse se distingue des HOX par la présence d'une boucle de 3 acides aminés supplémentaires (Three Amino acid Loop Extension) située à la position 24 entre les deux premières hélices alpha de l'homéodomaine.^{43,65} Les quelques 20 membres chez les mammifères qui présentent ce prolongement, fréquemment Pro-Tyr-Pro (PYP), se regroupent en 5 classes nommées à partir des domaines conservés qui les distinguent. On retrouve les classes PBC,⁶⁶ MEIS,⁶⁷ IRO,⁶⁸ TGIF⁴³ et la toute nouvelle MOHAWK.⁶⁵ Ce segment PYP sert d'interface dans les interactions avec les HOX.⁶⁹ On rapporte aussi la présence d'un petit acide aminé non-polaire (glycine (G), alanine (A) ou isoleucine (I)) à la position 50 de l'HD, qui juxtapose le résidu critique N51, plutôt qu'une glutamine (Q) chez les HOX.⁶⁵ Cet espace libre permettrait d'accommoder le fragment N-terminal du HD des HOX lors de leur interaction coopérative sur l'ADN, ou encore d'altérer la spécificité de la séquence d'ADN reconnue.⁷⁰ Pour leur potentiel de dimérisation avec les membres HOX et leur implication directe dans le développement de leucémies, je porterai une attention particulière aux membres des classes PBC et MEIS.

1.2.4.1 Classe PBC

Elle se caractérise par un large domaine bipartite conservé dans la portion N-terminale en amont de l'homéodomaine. Cette région étant présente dans 4 protéines chez les mammifères (*PBX1-PBX4*), 3 chez le nématode (*ceh-20*, *ceh-40* et *ceh-60*) et 1 chez la drosophile (*extradenticle*, *exd*), on le baptisa PBC, pour « *PBX* and *ceh-20* ». ⁶⁶ Ce long domaine PBC est séparé en 2 sous-domaines (PBC^A et PBC^B) de 80 et 95 résidus, respectivement, et sa séquence prédit une conformation de type hélice alpha propice aux interactions protéines-protéines (IPP).⁷¹ Les membres de cette famille possèdent également une séquence supplémentaire conservée de 13 acides aminés en aval de l'HD. *PBX1* fut découvert à partir de la translocation chromosomique E2A-*PBX1* trouvée dans près de 25% des leucémies lymphoblastiques de type pré-B chez le nourrisson.⁷²⁻⁷⁵ Parallèlement, on observait que des mutations dans le gène *exd* chez la drosophile provoquaient des transformations homéotiques similaires à celles observées avec le HOM-C. Puisque les

niveaux d'expression de ces derniers demeuraient inchangés, ça suggérait que *exd* exerce ses fonctions en collaboration avec les HOM-C.⁷⁶ PBX2 et PBX3 furent découverts à partir des homologies de séquence avec PBX1 tandis que PBX4 fut découvert récemment dans les spermatoocytes, où son expression semble être limitée.⁷⁷ Ces 4 PBX varient dans leur portion N- et C-terminale et on rapporte l'existence de multiples isoformes pour chacun, dont on commence à peine à comprendre les fonctions.⁷⁸⁻⁸⁰ De hauts niveaux de PBX2 et des niveaux plus faibles de PBX3 ont été détectés dans presque tous les tissus fœtaux et lignées cellulaires analysés. PBX1 de son côté démontre un profil d'expression plus restreint étant enrichi dans les cellules myéloïdes, le cœur et le cerveau.⁷⁸ Il est également connu que PBX1 est très enrichi dans les CSH de souris, suggérant à nouveau une interaction fonctionnelle avec les HOX.⁸¹

Les données disponibles concernant la régulation de la transcription de PBX1 s'accumulent et commencent à dresser un portrait intéressant. On rapporte d'abord une répression transcriptionnelle induite par GFI1 dans les cellules progénitrices granulo-monocytaires (GMP) qui permet de poursuivre le processus de maturation.⁸² De plus, l'expression de PBX1 semble régulée par NOTCH3 dans des cellules ovariennes via une interaction directe à la séquence promotrice. Qui plus est, l'inactivation de PBX1 par shRNA réduit la tumorigénicité induite par NOTCH3.⁸³ Similairement, MECOM, une protéine occasionnellement surexprimée dans certains sous-groupes de LMA, est recrutée au promoteur de PBX1 et stimule son expression. Dans ce contexte, PBX1 semble être partiellement requis pour la transformation cellulaire.⁸⁴ Supportant ces résultats, ZBTB16 (PLZF) réprime directement la transcription de PBX1, ce qui entraîne une baisse de prolifération des lignées cellulaires de mélanome.⁸⁵ Ces résultats suggèrent que PBX1 joue un rôle médiateur de premier plan dans la transformation cellulaire de plusieurs tissus induite par différents oncogènes. Finalement, on reconnaît une augmentation des transcrits et des protéines PBX1, PBX2 et PBX3 suite à une stimulation à l'acide rétinoïque qui, combinée aux profils d'expression mentionnés ci-dessus, suggère un rôle important lors de l'embryogenèse. Des études de retard sur gel ont révélé que les facteurs PBX seuls liaient une séquence consensus d'ADN TGATTGAT.⁸⁶ J'expliquerai plus bas comment ce site de liaison est modifié lorsque PBX interagit avec les HOX ou avec les MEIS.

1.2.4.2 Classe MEIS

Similaire aux PBC, la classe MEIS est caractérisée par la présence d'un domaine conservé en N-terminal de l'HD appelé MEIS. Pour éviter toute confusion, j'utiliserai l'autre terme connu pour

désigner cette région, soit le domaine « HM » pour Homothorax-MEIS. Il peut également être appelé « PIM », pour « PBX Interacting Motif ». Cette classe se divise en deux familles, MEIS et PREP, basées sur la présence de séquences conservées juxtaposant l'HD et en N-terminal. Le terme « PKNOX » (Pbx/Knotted homeobox) est parfois utilisé plutôt que « PREP » mais, pour éviter toute confusion avec KNOX, une homéoprotéine TALE retrouvée chez la plante, il est recommandé d'employer « PREP ». ^{65,87} Les deux termes sont toutefois utilisés dans cette thèse. La famille MEIS inclue 3 paralogues chez les vertébrés (*MEIS1-MEIS3*) et 1 chez le nématode et la drosophile (*ceh-25* et *homothorax (hth)*, respectivement) tandis que la famille PREP comprend 2 membres chez les mammifères (*PREP1-PREP2*) et 1 chez le nématode (*psa-3*). La drosophile n'a pas d'homologue PREP mais le gène aurait tout de même été préservé chez d'autres espèces comme le moustique. ⁶⁵ Le domaine HM d'environ 130 acides aminés est également bipartite (HM^A et HM^B) et il a été suggéré que les domaines HM et PBC auraient évolué à partir d'un ancêtre commun appelé MEINOX. ⁸⁸

Le gène *Meis1*, tout comme *Pbx1*, fut découvert dans un contexte de leucémogénèse. Effectivement, une lignée de souris (BXH-2), développant spontanément des leucémies par mutagenèse insertionnelle endogène, contenait des intégrations provirales à proximité du gène *Meis1* dans 15% des leucémies analysées. Ces intégrations corrélaient avec des niveaux élevés du transcrit suggérant une contribution directe dans le développement de leucémies. ⁸⁹ Il fut par la suite constaté que dans 95% de ces cancers, une insertion rétrovirale était concomitamment observée dans le gène *Hoxa7* ou *Hoxa9*, suggérant un effort concerté entre ces deux superfamilles d'homéoprotéines dans le développement de leucémies myéloïdes. ^{89,90} Ce résultat rappelle celui de l'homologue *hth* chez la drosophile qui, lorsque muté, engendre des transformations homéotiques postérieures des segments thoraciques et abdominaux, sans perturbations apparentes des niveaux de HOM-C. ⁹¹ Cette ressemblance avec les HOX rappelle le phénotype d'*exd* et suggère que MEIS pourrait aussi être un de leurs cofacteurs.

La régulation de *MEIS1* fait intervenir différents mécanismes qui pourraient expliquer son profil d'expression souvent transitoire et spécifique. On rapporte une stimulation par différents facteurs de transcription comme CREB1 (sang), ⁹² ELF1 (sang), ⁹³ OCT4 (neurone), ⁹⁴ GFI1 (sang) ⁸² et la translocation NUP98-HOXA9 (sang). ⁹⁵ Les séquences génétiques régulatrices sont également sujettes à méthylation dans plusieurs types de cancer, ⁹⁶⁻⁹⁸ ainsi qu'à un contrôle épigénétique par les répresseurs Polycomb (PcG) et l'activateur KMT2A (qui régule également *HOXA9*). ^{99,100} À l'instar des PBX, les niveaux de MEIS1 sont également sensibles à une stimu-

lation par l'acide rétinoïque.¹⁰¹ Finalement, une analyse précoce des éléments régulateurs *en cis* révèlent la présence de plusieurs amplificateurs dont certains pourraient être rattachés au promoteur via une boucle stabilisée par l'isolateur CTCF.^{98,102-104} Tout comme les PBX, les MEIS sont sujets à l'épissage alternatif, dont certains excisent l'HD, et plusieurs groupes travaillent présentement à comprendre leur rôle biologique.^{105,106}

PREP1 fut découvert de par son association directe avec PBX1 sur des séquences régulatrices du gène *PLAU* et hérita conséquemment du nom « Pbx REgulating Protein 1 ». PREP2 fut identifié par homologie de séquences et montrait une conservation similaire sur 59% de la protéine. Tandis que PREP1 semble ubiquitaire, le profil d'expression de PREP2 semble plus restreint et présente des niveaux de transcrits moins élevés.^{87,107} Dans l'ensemble les régulateurs de l'expression des PREP sont méconnus. Finalement, des études de retard sur gel et d'hybridation sur micropuce ont montré que MEIS et PREP se lient à la même séquence d'ADN TGA-CAG.⁷⁰

1.2.5 Fonctions des homéoprotéines lors de l'hématopoïèse normale

Plusieurs modèles génétiques de souris ont été générés afin d'élucider les rôles joués par les HOX et les TALE au cours de l'hématopoïèse. On constata que les ablations singulières de gènes HOX n'engendraient que des phénotypes subtils tandis que celles des TALE présentaient de multiples anomalies majeures. Ces résultats, exposés ci-dessous, suggèrent que les cofacteurs TALE collaborent avec plusieurs HOX dans l'accomplissement de leurs fonctions biologiques diverses.

1.2.5.1 Superclasse Antennapedia

La forte expression de plusieurs membres des HOXA, HOXB et HOXC dans le compartiment des cellules hématopoïétiques immatures évoque un rôle de premier plan pour ces gènes dans la régulation de l'arbre hématopoïétique. La délétion singulière de gènes HOX a permis d'élucider quelques-uns de leurs rôles lors de l'hématopoïèse mais l'évaluation de leurs fonctions précises a été fortement limitée par leur redondance et leur compensation fonctionnelle.

Ainsi, les gènes *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxb6* et *Hoxc8* sont tous des régulateurs des cellules progénitrices érythro-mégacaryocytaires (MEP) à divers niveaux.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Parallèlement, les cellules souches hématopoïétiques des souris double-mutante *Hoxb3/Hoxb4* sont fonctionnelles

mais performant légèrement moins bien que les cellules de type sauvage dans un essai de reconstitution compétitive, un phénotype qui semble additif par rapport aux mutants simples.¹¹²⁻¹¹⁴ Étrangement, la délétion presque complète du locus HOXB (*Hoxb1-Hoxb9*) n'a aucun effet sur le potentiel de reconstitution des cellules souches ou sur la génération des différentes lignées hématopoïétiques. Que la délétion des gènes [*Hoxb1-Hoxb9*] soit moins néfaste que celle des gènes *Hoxb3/Hoxb4* est contre-intuitif et souligne, si nécessaire, toute la complexité derrière la régulation et la fonction des gènes HOX. Par exemple, on pourrait supposer que l'ablation du locus complet prévient un débalancement des ratios HOX antérieurs : HOX postérieurs pouvant ainsi affecter l'identité cellulaire. Alternativement, l'expression accrue de *Hoxc4* pourrait compenser pour la perte des HOXB, d'autant plus qu'une surexpression de ce gène augmente l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques immatures.¹¹⁵ Finalement, la délétion unique de *Hoxa9*, le représentant HOX le plus exprimé dans les CSH, induit un des plus sévères phénotypes, avec des défauts au niveau de toutes les lignées matures en plus des CSH.¹¹⁶⁻¹¹⁸ En ce sens, une délétion hétérozygote du locus HOXA en entier est également néfaste pour le potentiel de repopulation des cellules souches et provoque un débalancement de la production des progéniteurs.¹¹⁹ Ces résultats en demi-teintes suggèrent que la plupart des HOX, lorsque évalués individuellement, sont requis mais non-essentiels pour la production et le maintien des lignées hématopoïétiques et contrastent avec les phénotypes dominants observés à la suite d'expérimentations de gain-de-fonction. Ces conséquences, souvent une surprolifération d'un sous-compartiment cellulaire, seront abordées dans la **Section 1.2.7**.

1.2.5.2 Classe des PBC

1.2.5.2.1 PBX1

L'inactivation de PBX1 chez la souris est létale à partir du jour embryonnaire E15.5 et s'accompagne d'une mosaïque de phénotypes affectant le développement de plusieurs organes tels les poumons, le pancréas, le foie, l'estomac, la rate et les reins et qui concorde avec son profil d'expression.¹²⁰⁻¹²⁴ On rapporte également de multiples malformations squelettiques axiales ainsi que des défauts au niveau des stylopoies des membres en développement, concordant avec le patron d'expression de PBX1 dans la région proximale.¹²⁵ Ces malformations le long de l'axe proximo-distal surviennent indépendamment des niveaux d'expression et de la localisation cellulaire de MEIS1. Plusieurs de ces phénotypes rappellent en partie certains défauts observés suite à l'inactivation des gènes HOX, suggérant une collaboration avec PBX1 dans le dévelop-

pement de certains tissus embryonnaires.^{120,121}

L'analyse du foie fœtal, l'organe hématopoïétique embryonnaire, révéla une hypoplasie accompagnée d'une diminution conséquente de la cellularité de tous les compartiments hématopoïétiques. Les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) semblent cependant davantage affectés, autant au niveau du nombre relatif de cellules et de leur prolifération qu'en leur capacité fonctionnelle à générer des cellules de la lignée mégacaryo-érythrocytaire. Ces résultats sont concordants avec la forte anémie observée chez les embryons mutants et suggère un rôle pour PBX1 dans la spécification et la prolifération des CMP.¹²⁶ Il a également été montré que les CSH mutées pour *Pbx1* étaient incapables de compétitionner avec des cellules de type sauvage dans la reconstitution à long-terme du système hématopoïétique de souris irradiées. En ce sens, l'inactivation conditionnelle de PBX1 chez les souris adultes mène rapidement à une diminution marquée du nombre de CSH. Les analyses de cycle cellulaire ont permis de constater que l'absence de *Pbx1*, qui est fortement exprimé dans la population souche hématopoïétique,⁸¹ force les CSH normalement quiescentes à initier un nouveau cycle. Cette prolifération active et aberrante aurait pour conséquence de les mener rapidement à l'épuisement.¹²⁷

De ces souris conditionnelles *Pbx1* mutantes, on rapporte également une forte perturbation fonctionnelle des progéniteurs lymphocytaires de type B. Puisqu'une délétion spécifique de *Pbx1* dans le compartiment des cellules immatures pro-B ne perturbe pas la maturation subséquente des lymphocytes B, la fonction de *Pbx1* dans la lymphopoïèse doit nécessairement survenir en amont, possiblement même avant le stade des progéniteurs communs lymphoïdes (CLP).¹²⁸ Cette constatation a beaucoup d'implications pour la translocation leucémique qui fusionne l'homéodomaine de PBX1 avec un autre régulateur lymphocytaire B, E2A. Les mécanismes de transformation proposés seront abordés à la **Section 1.2.7**.

1.2.5.2.2 PBX2 et PBX3

L'inactivation complète chez la souris d'un autre gène de la famille PBC, *Pbx2*, ne résulte curieusement en aucun phénotype. Effectivement, les souris mutantes se développent bien, présentent un système immunologique et hématopoïétique phénotypiquement normaux, naissent selon un ratio mendélien attendu et ne présentent aucune anomalie majeure au cours de leur vie. Ces résultats contrastent fortement avec les conséquences pléiotropiques observées suivant la délétion du gène *Pbx1*, et sont difficilement réconciliables avec l'étendue de l'expression de PBX2 dans une mosaïque de tissus chez l'embryon et chez l'adulte. Cette absence de phénotype pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle entre les membres de la famille PBX.

Même si la perte de *Pbx2* n'induit pas une expression accrue de PBX1 ou PBX3, on doit noter que *Pbx2* n'est pas le membre le plus exprimé de la famille PBC dans la plupart des tissus embryonnaires. De plus, la détection d'une co-expression de PBX2 et PBX1 dans certains tissus communs, comme le thymus ou la moelle osseuse, a poussé les auteurs de cette étude à suggérer un mécanisme de compensation fonctionnelle basée sur un niveau seuil d'expression des gènes *Pbx* totaux, indépendamment de leur paralogie. Il s'agit ici d'une hypothèse intéressante qui est supportée par l'observation, chez les souris *Pbx1^{-/-}Pbx2^{+/-}* double-mutantes, d'un phénotype d'une plus grande sévérité en comparaison des souris *Pbx1^{-/-}* (mort embryonnaire au jour E13.5 par rapport à E15.5, respectivement).^{129,130}

Les résultats de cette étude suggèrent que *Pbx2* est un gène en apparence non-essentiel. Nous ne pouvons toutefois exclure la possibilité qu'il soit impliqué dans le maintien à long-terme du potentiel d'auto-renouvellement des CSH, une fonction qui pourrait être étudiée à l'aide de transplantations successives dans des souris receveuses ou par l'imposition d'un stress réplicatif répété comme un traitement au 5-FU, qui est toxique pour les cellules progénitrices en prolifération. De son côté, le gène *Pbx3* est exprimé abondamment dans l'embryon et son patron d'expression devient plus spécifique au cours du processus développemental, se restreignant graduellement à quelques tissus du système nerveux central comme le bulbe rachidien, l'hypothalamus ainsi qu'à des cellules chondrocytaires et musculaires lisses intestinales. L'inactivation de *Pbx3* est létale quelques heures seulement après la naissance. Les souris sont de taille normale et correctement formées mais présentent des signes de cyanose suggérant une défaillance respiratoire. Une interaction des protéines PBX3, MEIS1 et TLX3 a été détectée dans les cellules saines du myélocéphale et suggèrent par conséquent un rôle pour ce complexe transcriptionnel dans le développement du centre de contrôle respiratoire. Les fonctions de *Pbx3* dans l'hématopoïèse n'ont pas été étudiées mais la faible expression détectée dans le foie fœtal suggère qu'il ne s'agit pas d'un de ses rôles principaux.^{131,132}

1.2.5.3 MEIS1

En ce qui concerne l'étude des fonctions de MEIS1, deux modèles distincts d'inactivation génétique chez la souris ont été conçus. Le premier consiste en une délétion de l'homéodomaine et de la portion C-terminale, produisant des niveaux détectables d'une protéine tronquée contenant le domaine HM (*Meis1^{-/-}*).¹³³ Le deuxième modèle consiste en l'insertion d'une cassette du récepteur à estrogènes dans le cadre de lecture de la séquence de l'isoforme *Meis1a* (*Mei-*

sIa^{ER}). En l'absence de ligand tel que le tamoxifen, la protéine MEIS1A est confinée dans le cytoplasme et est considérée inactive.¹³⁴ Les 2 stratégies permettent la génération de souris mutantes présentant des phénotypes pléiotropiques similaires comme des hémorragies internes, une angiogenèse dysfonctionnelle et une mortalité entre les jours E11.5 et E14.5. Aucun des deux modèles ne présente de malformations au niveau des membres, contrairement à ce qui est observé suite à l'inactivation de *Pbx1*. Cette absence de phénotype pourrait s'expliquer par l'expression du domaine HM de MEIS1 dans le premier modèle, toujours capable d'interagir avec les protéines PBX et d'induire le changement de conformation nécessaire à la translocation nucléaire du complexe. Parallèlement, le deuxième modèle ne peut exclure la possibilité d'une localisation nucléaire de MEIS1-ER induite par l'interaction avec PBX indépendamment de la présence de tamoxifen (voir **Section 1.2.8.1**). Dans le cas du deuxième modèle, les phénotypes observés pourraient plutôt être induits par la diminution significative observée des niveaux totaux de MEIS1A (hypomorphe) et/ou par l'absence complète de l'isoforme MEIS1B. Dans cette optique, il est intéressant de noter que les deux modèles présentent tout de même une différence phénotypique au niveau de la formation oculaire (*Meis1*^{-/-}; taille réduite du cristallin). L'hématopoïèse fœtale est également perturbée comme en font foi l'absence de mégacaryocytes, l'hypoplasie du foie et la diminution correspondante des différents progéniteurs, suggérant notamment une dysfonction du compartiment souche des cellules hématopoïétiques. Confirmant un défaut au niveau des CSH, les cellules *Meis1*^{-/-} compétitionnent pauvrement les cellules de type sauvage lors d'essais de reconstitution compétitive, une observation comparable à l'effet d'une inactivation du gène *Pbx1*.

L'étude des fonctions de *Meis1* dans les souris adultes a été effectuée par l'entremise d'inactivation génétique conditionnelle et a permis de confirmer l'incapacité des CSH mutantes à compétitionner les cellules saines lors de la reconstitution du système hématopoïétique des souris receveuses.¹³⁵⁻¹³⁷ Également, à l'instar des souris conditionnelles *Pbx1*, les CSH *Meis1* mutantes quittent inexorablement leur état quiescent pour favoriser l'initiation d'un nouveau cycle cellulaire, pointant vers un problème d'auto-renouvellement ou d'épuisement prématuré. Ces hypothèses sont supportées par l'incapacité de ces cellules à reconstituer le système hématopoïétique déplété à la suite de traitements 5-FU répétés. Au niveau mécanistique, ce phénotype rejoint celui observé par l'inactivation des gènes *Hif*, impliqués dans la réponse métabolique au stress oxydatif. L'inactivation aigüe de *Meis1* induit une diminution de l'expression des gènes *Hif1a* et

Hif2a, une augmentation de la consommation et de la production de dérivés réactifs d'oxygène (ROS) ainsi qu'une diminution du métabolisme glycolytique anaérobie. Ces effets suggèrent un rôle pour *Meis1* dans la réponse des CSH au stress oxydatif, une hypothèse partiellement supportée par l'augmentation du nombre de colonies formées par les CSH mutantes en réponse à un traitement anti-oxydatif comme le N-acétylcystéine (NAC).

Parallèlement, on observe une diminution du nombre de progéniteurs fonctionnels corrélant avec la perte progressive du compartiment souche. Au temps observé, les cellules matures ne sont toutefois pas affectées à l'exception des cellules pré- et pro-B et des mégacaryocytes. Curieusement, l'inactivation de *Pbx1* entraîne également une perte de quiescence des CSH et une diminution des progéniteurs lymphocytaires de type B, suggérant une collaboration fonctionnelle entre MEIS1 et PBX1 dans plusieurs processus hématopoïétiques. Cette observation concorde d'ailleurs avec un chevauchement des gènes différentiellement régulés suite à l'inactivation de *Meis1* et *Pbx1*.^{136,137} Finalement, le rôle de MEIS1 dans la spécification mégacaryocytaire fut confirmé par une étude de gain-de-fonction dans des cellules souches embryonnaires qui révéla une inhibition de la lignée érythroïde en faveur de la lignée mégacaryocytaire.¹³⁸ De manière intéressante, un phénotype similaire a été déjà observé à la suite d'une réduction des niveaux de *Hoxa5*.¹⁰⁸ Qui plus est, le complexe MEIS/PREP-PBX est connu pour réguler l'expression de la cytokine de plaquettes PF4.^{139,140} Il se pourrait que cette activité transcriptionnelle soit partiellement responsable du défaut angiogénique des souris *Meis1* mutantes.¹⁴¹ Ensemble, ces résultats démontrent les différents rôles clés joués par l'homéoprotéine MEIS1 dans le destin et la prolifération des cellules hématopoïétiques.

1.2.5.4 PREP1

L'étude des fonctions de PREP1 chez la souris s'est avérée plus ardue en partie parce que la délétion complète du gène conduit à une mort embryonnaire précoce au jour E7.5.¹⁴² Les chercheurs se sont par conséquent rabattus sur l'analyse d'un modèle de souris hypomorphe (*Prep1^{hi}*) exprimant des niveaux de PREP1 réduits de 90-97%. Une difficulté supplémentaire associée à cette souris mutante vient de la pénétrance variable des phénotypes allant d'une mort embryonnaire autour du jour E17.5 chez 75% des embryons mais permettant également une naissance et une vie adulte « relativement » normale (voir ci-dessous) pour les 25% restants.¹⁴³ À partir de la gamme de phénotypes observés chez les embryons *Prep1^{hi}*, on peut tracer un parallèle évident avec les malformations observées chez les souris *Pbx1^{-/-}* ou *Meis1^{-/-}*: on rapporte notamment une

hypoplasie de plusieurs organes et une anémie sévère (*Pbx1*) ainsi qu'une angiogenèse compromise, des malformations oculaires et des hémorragies internes (*Meis1*). Ces phénotypes pourraient s'expliquer en partie par une diminution de l'expression et/ou de la stabilité de PBX1, PBX2 et MEIS1 observées dans plusieurs tissus. Ces résultats combinés à une co-expression des TALE dans les mêmes types cellulaires (par exemple, MEIS1 et PREP1 dans la rétine neurale) suggèrent une collaboration entre ces facteurs dans l'accomplissement de programmes transcriptionnels non-redondants au cours de plusieurs processus biologiques. Cette hypothèse est supportée par les défauts oculaires occasionnés par la délétion conditionnelle de *Pbx1*.¹⁴⁴

L'inactivation partielle de *Prep1* induit également des défaillances au niveau de plusieurs lignées hématopoïétiques. On rapporte d'abord une hypoplasie des foies fœtaux *Prep1ⁱⁱ* qui, à l'image des mutants *Pbx1^{-/-}* et *Meis1^{-/-}*, corrèle avec une production compromise de progéniteurs fonctionnels (CFU-GEMM). De plus, les cellules mutantes offrent un potentiel de radioprotection diminué en comparaison aux cellules saines et démontrent un faible potentiel compétitif lors de la reconstitution du système hématopoïétique, soulignant une implication plausible de *Prep1* dans l'auto-renouvellement des CSH. On constate en deuxième lieu un blocage aux stades pro- et pré-B lors de la maturation des lymphocytes B, ce qui a été récemment confirmé à partir d'un modèle d'inactivation conditionnelle (*Prep1^{-/-}*).^{145,146} Ces résultats suggèrent une fonction concertée possible avec PBX1 dont l'inactivation corrèle également avec un défaut de maturation significatif des lymphocytes B.

De l'analyse des souris ayant survécu jusqu'à l'âge adulte, on rapporte finalement un blocage partiel lors de la thymopoïèse dont découle une diminution du nombre total de cellules CD4⁺ et CD8⁺.¹⁴⁷ Cette observation est supportée par une augmentation concomitante du nombre de précurseurs lymphocytaires TCR $\gamma\delta$ doubles négatifs et, tenant compte de la transmissibilité de ce phénotype à des souris receveuses, suggère un défaut de maturation ou de spécification lors de la lymphopoïèse T. Une diminution de PBX2 est également observée dans ce système en réponse à une diminution des niveaux de PREP1. Puisque que *Pbx2* y semble superflu (voir ci-dessus), l'implication et la nature de cette régulation restent encore à définir. Il est intéressant de noter que des 25% de souris *Prep1ⁱⁱ* hypomorphes qui se rendent à terme, 40% développent des tumeurs ou des lésions précancéreuses avant le 20^e mois (contre 15% chez les souris de type sauvage). Des lymphomes B et T constituaient 75% (3/4) des tumeurs observées tandis que 4/6 souris ayant été transplantées par des cellules *Prep1ⁱⁱ* ont à leur tour développé des lymphomes après une longue période de latence (7-19 mois). Ces résultats concordent avec

un rôle de PREP1 lors de la lymphopoïèse, tel que mentionné ci-dessus, en plus de lui attribuer une fonction probable de suppresseur de tumeur. Cet aspect sera davantage développé dans la **Section 1.2.7**.

Malgré la grande variabilité des phénotypes observés dans les souris *Prep1ⁱⁱ*, l'ensemble de ces études établit sans l'ombre d'un doute le rôle prépondérant joué par PREP1 mais aussi par PBX1 et MEIS1 dans l'établissement et le maintien des processus hématopoïétiques. La similarité et la gravité des phénotypes observés suite à l'inactivation des différents gènes TALE suggèrent une fonction concertée entre ces facteurs et soulignent l'importance d'une régulation appropriée dans la prévention de maladies. Finalement, alors que l'inactivation chez la souris des gènes *Hox* ne provoque généralement que des phénotypes « mineurs », la délétion d'un de leurs cofacteurs induit des phénotypes catastrophiques et pourrait refléter la perturbation simultanée d'une multitude de fonctions HOX-dépendantes. À l'inverse, il est également possible que plusieurs de ces manifestations fassent intervenir différents partenaires non-HOX comme PDX1 dans le pancréas ou TLX3 dans le bulbe rachidien. Ces études confirment la nécessité de bien comprendre les différentes fonctions exercées par ces cofacteurs lors de l'hématopoïèse.

1.2.6 Incidence de la signature HOX/MEIS/PBX dans les leucémies humaines

À l'instar des aberrations chromosomiques, des petites insertions-délétions et des mutations ponctuelles, les transcriptomes de cellules transformées sont également utiles au diagnostic. En 1999, un groupe de recherche parvint à utiliser des profils transcriptionnels pour efficacement catégoriser les leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës sans connaissance préalable des données cliniques des échantillons. Ils utilisèrent par ailleurs cette approche pour corrélérer le niveau d'expression *HOXA9* avec le risque d'échec thérapeutique.¹⁴⁸ L'augmentation des études transcriptomiques disponibles nous a permis de détecter une expression élevée et récurrente de certains gènes *Hox*, *Meis* et *Pbx*, dénommée ici « Signature HOX/MEIS/PBX », dans une large proportion de patients leucémiques arborant différents profils mutationnels. Depuis, cette signature a pu être utilisée dans plusieurs études en tant qu'outil pronostique, corrélant la survie des patients avec les niveaux d'expression de ces gènes.^{149,150} Bien plus qu'un simple reflet d'un état cellulaire transformé, cette expression coordonnée semble jouer un rôle de premier plan dans le développement leucémique, supportant une fois de plus l'implication de ces facteurs lors de l'hématopoïèse. Les conséquences potentielles de ces dérégulations transcriptionnelles seront abordées dans la **Section 1.2.7**. Tout au long de cette section, les lecteurs seront appelés à se

référer au **Tableau 1.1.**

Tableau 1.1 Anomalies génétiques menant à une dérégulation HOX/MEIS/PBX

Cytogénétique	Hémopathie	Gènes	Taxum
t(11;21;12); cryptic	AML	NUP98-KDM5A	H-M
t(11;17)(p15;p13)	AML	NUP98-PHF23	M
t(5;11)(q35;p15)	AML	NUP98-NSD1	H-M
inv(11)(p15q22)	t-MDS; AML; CML	NUP98-DDX10	H
t(7;11)(p15;p15)	AML; CML	NUP98-HOXA9	H-M
t(2;11)(q31;p15)	AML; MDS; CML	NUP98-HOXD13	M
Engineered		NUP98-HOXA10	M
t(1;11)(q23;p15)	t-AML	NUP98-PMX1	M
t(10;11)(q23;p15)	AML	NUP98-HHEX	M
t(9;9)(q34;q34)	AUL	SET-NUP214	H
t(6;9)(p23;q34)	AML; MDS	DEK-NUP214	H
t(4;11)(q21;q23)	B-ALL; AML	KMT2A-AFF1	H
t(6;11)(q27;q23)	AML	KMT2A-MLLT4	M-H
t(9;11)(p22;q23)	AML; t-AML	KMT2A-MLLT3	M
t(10;11)(p12;q23)	AML	KMT2A-MLLT10	H
t(11;17)(q23;q21)	AML; MDS	KMT2A-MLLT6	H
t(11;16)(q23;p13)	t-AML	KMT2A-CREBBP	H
t(11;19)(q23;p13)	ALL; AML; t-AML	KMT2A-MLLT1	M+H
t(11;22)(q23;q13)	t-AML	KMT2A-p300	H
t(6;11)(q13;q23)	AML	KMT2A-SMAP1	H
Engineered		KMT2A-FKBP	M
t(11;19)(q23;p13)	AML	KMT2A-SH3GL1	M
+8	CML; MDS; AML; ALL		H
CN	AML;	NPM1c	H-M
t(1;19)(q23;p13)	B-T-ALL;	E2A-PBX1	H
t(7;17)(p15;q23)	CML	MSI2-HOXA9	H
amplification 11	AML; MDS	KMT2A	H
PTD	AML	KMT2A	M
CN	MDS; CML; AML;	TET2	H+M
inv(7)(p15q34)	T-ALL	TCRb-HOXA	H
t(8;16)(p11;p13)	AML; t-AML	KAT6A-CREBBP	H
t(10;11)(q13;p21)	ALL, AML	PICALM-MLLT10	H-M

H: *Homo Sapiens*; M: *Mus musculus*

CN: caryotype normal; PTD: Duplication partielle en tandem; AML: Leucémie myéloïde aiguë; CML: Leucémie myéloïde chronique; MDS: Syndrome myélodysplasique; ALL: Leucémie lymphoblastique aiguë; t-: reliée à une thérapie; AUL: Leucémie aiguë non-différenciée

1.2.6.1 KMT2A (MLL)

Une translocation impliquant le gène *KMT2A*, mieux connu sous le nom de *MLL*, est observée dans environ 70% des LLA du nourrisson, 10% des LLA ainsi que dans 10% et 3% des LMA post-thérapie et *de novo*, respectivement.^{151,152} Deux anomalies génétiques supplémentaires, une duplication partielle en tandem de la région N-terminale et une amplification du chromosome 11, sont également observées dans certains cas de LMA et de SMD.^{153,154} À ce jour, on dénombre plus de 60 partenaires de fusion différents compliquant significativement l'établissement d'un mécanisme transformant commun (<http://atlasgeneticson-cology.org/Genes/MLL.html>). La délétion homozygote du gène *Kmt2a* provoque une mort embryonnaire au jour E10.5.¹⁵⁵ Les souris hétérozygotes sont viables mais présentent des défauts de spécifications squelettiques et des transformations homéotiques rappelant ceux observés par l'altération des gènes HOX.¹⁵⁵ L'observation des patrons d'expression de HOXA7 dans les souris *Kmt2a* homozygotes suggère un rôle de KMT2A dans la régulation de l'expression des HOX.¹⁵⁶ À cet égard, cette fonction antagonise directement l'activité du complexe répresseur PcG.¹⁵⁷ Suggérant au passage l'importance des HOX dans l'hématopoïèse, l'inactivation conditionnelle de *Kmt2A* provoque un défaut majeur d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques.^{158,159}

Le gène *KMT2A* code pour une vaste protéine multi-domaines de 3972 acides aminés qui est d'abord soumis à un clivage post-traductionnel par la Taspase1 dans le cytoplasme avant de se réassembler par hétérodimérisation (**Figure 1.4**).¹⁶⁰ La portion N-terminale contient plusieurs domaines qui vont cibler la protéine à l'ADN de différentes façons. Il y a d'abord des domaines « AT-Hook » qui reconnaissent des séquences AT-riches dans les sillons mineurs de l'ADN.¹⁶¹ On retrouve également une séquence CxxC qui se lie spécifiquement à des dinucléotides CpG non-méthylés ainsi que des domaines PHD (Plant HomeoDomain) impliqués notamment dans la reconnaissance de modifications épigénétiques des nucléosomes.^{162,163} Finalement, on retrouve un motif responsable de l'interaction avec le suppresseur de tumeur MENIN (MEN1) qui attire à son tour le coactivateur LEDGF, des interactions essentielles pour le potentiel oncogénique des fusions KMT2A.¹⁶⁴ Le fragment C-terminal contient un domaine SET (Su(var)3-9 and Enhancer of Zeste) qui permet la méthylation de la lysine (K) 4 de l'histone H3 (H3K4), une marque épigénétique retrouvée sur tous les promoteurs de gènes actifs.¹⁶⁵ Ce domaine se retrouve au cœur d'un complexe modificateur de la chromatine (COMPASS) qui inclue notamment les protéines WDR5, l'histone acétyltransférase KAT8 (MOF), qui modifie la K16 de l'histone H4, ainsi que RBBP5 et ASH2L.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ Ces partenaires assistent KMT2A dans

l'établissement d'un environnement nucléosomal permissif. Les points de cassure sont regroupés entre le domaine CxxC et PHD, excluant du même coup le domaine SET et son activité intrinsèque H3K4 méthyltransférase des produits de translocation (**Figure 1.4**).

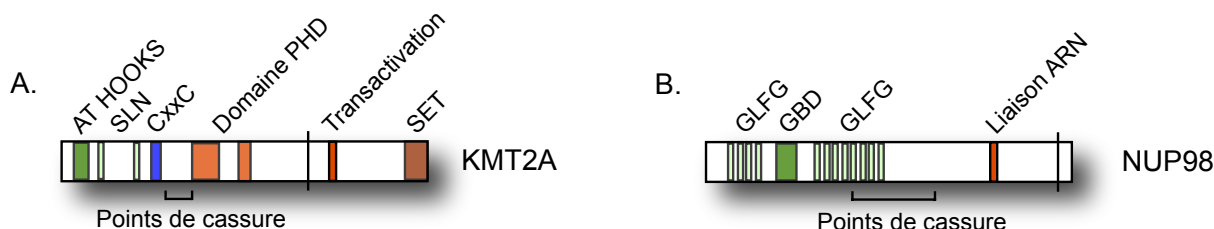


Figure 1.4 Structure des protéines KMT2A et NUP98.

A) La protéine KMT2A possède, de la gauche vers la droite : des domaines AT-HOOK de liaison à l'ADN, des signaux de localisation nucléaire (SLN), un domaine de liaison à l'ADN non-méthylé (CxxC), des domaines PHD, un site de clivage protéolytique (ligne verticale), un domaine de transactivation et un domaine catalytique SET. Les réarrangements se produisent dans la région des points de fusion. B) La protéine NUP98 contient des régions riches en G, F, L (GLFG). GBD : GBD : domaine de liaison GLEBS.

Plusieurs mécanismes ont été mis de l'avant pour expliquer le rôle des fusions KMT2A dans la leucémogénèse. Quelques-uns seront abordés ci-dessous et les translocations associées à une signature HOX/MEIS/PBX seront soulignées au passage (**Tableau 1.1**).

(1) Parmi cette liste, six correspondent au sous-groupe de partenaires le plus fréquemment juxtaposé à *KMT2A* : AFF1 (AF4/MLLT2), MLLT3 (AF9), MLLT1 (ENL), MLLT4 (AF6), MLLT10 (AF10) et ELL, représentant à eux seuls 85% des translocations impliquant *KMT2A*.^{170,171} Surprenamment, des études révélèrent que MLLT1 interagissait en complexe avec d'autres partenaires de fusion tels qu'AFF1, MLLT3 ainsi qu'avec le facteur d'élongation transcriptionnelle CDK9 (sous-unité de pTEFb). La méthyltransférase DOT1L, qui appose un groupement méthyle sur la K79 de l'histone H3 (une marque associée à l'élongation), co-purifie également avec ces facteurs transcriptionnels.^{172,173} Ces complexes, dont l'appellation varie selon la présence de certains constituants (EAP, SEC, DotCom),¹⁷⁴ peuvent parfois inclure les autres facteurs ELL et MLLT10. Que la signature HOX/MEIS/PBX soit corrélée avec les translocations impliquant chacun des membres de ces complexes supporte un rôle pour KMT2A et ses partenaires dans l'élongation transcriptionnelle aberrante de certains gènes cibles. Parallè-

lement, ces translocations pourraient promouvoir l'élongation par le recrutement de plusieurs protéines du complexe modificateur de la chromatine SWI/SNF.¹⁷⁵

(2) De surcroît, parmi les translocations retrouvées au **Tableau 1.1**, on retrouve KMT2A-CREBBP (CBP) et KMT2A-SH3GL1 (EEN). Peu de choses sont connues quant au mécanisme impliqué dans les transformations induites par ces partenaires, sinon que la présence des domaines Histone AcétylTransférase (HAT) et bromodomaine (liaison aux lysines acétylées) de CREBBP est requise pour la transformation.¹⁷⁶ Également, il semble que la protéine SH3GL1 soit impliquée dans une cascade de modifications nucléosomales allant de H4R3me (via PRMT1) à H3/H4Ac par un mécanisme encore indéfini.¹⁷⁷ De manière générale, il semble que le recrutement constant d'une acétyltransférase par l'intermédiaire d'un produit de translocation promeuve une conformation de chromatine permissive à la transcription aberrante de gènes cibles.

(3) Plusieurs des protéines fusionnées localisent normalement dans le cytoplasme et leur contribution à la transformation cellulaire lorsque juxtaposées à KMT2A resta longtemps un mystère. La constatation que la formation d'un oligomère de KMT2A tronqué était suffisante pour la transformation supposait que certains des partenaires pouvaient également provoquer cette dimérisation.¹⁷⁸ Ainsi, MLLT6 (AF17) et MLLT10 (AF10) pourraient contribuer au développement de leucémie de KMT2A en induisant une dimérisation par leur domaine « coiled-coil ».¹⁷⁹ Le mode d'action d'un oncogène KMT2A homodimérisé reste encore toutefois à définir.

Parmi les cibles identifiées des fusions KMT2A, on remarque les gènes *Hoxa9*, *Meis1* et *Pbx3*, concordant avec le rôle de KMT2A dans le maintien de l'expression de *Hoxa7* lors du développement embryonnaire. Cette régulation transcriptionnelle s'accompagne d'une augmentation du niveau des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K79me2 (DOT1L), supportant le mécanisme lié à l'élongation.^{100,165,180,181}

1.2.6.2 NUP98

Le gène *Nup98* code pour une protéine de 90 kDa dont la fonction principale consiste à réguler le transport cyto-nucléoplasmique de macromolécules à travers les pores nucléaires (**Figure 1.4**). À ce jour 30 partenaires de fusions de NUP98 ont été détectés dans des LMA, des LLA, des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) ainsi que des SMD (<http://cgap.nci.nih.gov/cgap.html>; Avril 2014). Le point de fusion de la protéine NUP98 varie peu et préserve sys-

tématiquement la portion N-terminale contenant une série de domaines répétés riches en Gly-Leu-Phe-Gly (GLFG). Une revue de la littérature nous a permis de corrélérer la présence de 9 de ces translocations avec une dérégulation de la signature HOX/MEIS/PBX (**Tableau 1.1**). Parmi ces partenaires obligés, on signale la présence de 3 HOX (HOXA9, HOXA10 et HOXD13), 2 homéoprotéines non-HOX (HHEX et PMX1) ainsi que 3 protéines (KDM5A, NSD1, PHF23) contenant un domaine PHD. Invariablement, les domaines de liaison à l'ADN ou à la chromatine de ces partenaires sont conservés, suggérant que le processus de transformation cellulaire implique un recrutement aberrant de la portion N-terminale de NUP98 à l'ADN. Étonnamment, il a été suggéré qu'au-delà de ses fonctions de transporteur nucléaire, NUP98 jouait aussi un rôle dans la transcription de gènes cibles en s'associant avec l'ARN polymérase II (ARN Pol. II) et avec les coactivateurs CREBBP/P300 via ses domaines GLFG.¹⁸²

Il est possible que l'expression élevée de HOX/MEIS/PBX résulte du recrutement direct des protéines de fusion aux séquences régulatrices *en cis* des gènes cibles.^{183,184} On rapporte la liaison de NUP98-KDM5A, NUP98-NSD1 et NUP98-PHF23 aux promoteurs des gènes HOXA résultant en l'augmentation subséquente des transcrits *Hox*.¹⁸⁴ La perte de transformation induite par l'ablation ou la mutation des domaines PHD et GLFG corrèle avec une baisse des niveaux de *Hoxa9* et suggère que l'établissement d'une chromatine permissive est important lors de la transformation leucémique. Ce modèle pourrait également être valide dans des cellules leucémiques exprimant le produit de translocation SET-NUP214, qui contient la région FG de la nucléopore NUP214 en C-terminal de l'histone méthyltransférase SET.¹⁸⁵

1.2.6.3 NPM1c

Nucléophosmine (NPM1) est une petite protéine basique multi-fonctionnelle principalement localisée dans les nucléoles et capable de s'associer avec une grande variété de protéines dont les histones et les protéines ribosomales.¹⁸⁶ Capable de transiter rapidement du noyau au cytoplasme, on lui attribue en plus des rôles dans des processus cellulaires diversifiés tels la biogenèse des ribosomes, la réparation et transcription de l'ADN ainsi que dans la duplication des centrosomes.¹⁸⁷⁻¹⁹¹ Conséquemment, l'inactivation complète de *Npm1* chez la souris mène à des duplications de centrosomes, une instabilité génomique et une biogenèse défectueuse des ribosomes.¹⁹² Un peu moins de 35% des LMA présentent une mutation dans le gène *NPM1*, ce qui en fait l'un des gènes les plus fréquemment mutés. La mutation consiste en une insertion d'une variété de tétranucléotides dans l'exon 12 qui introduit un nouveau signal d'exportation

nucléaire (SEN) en C-terminal et élimine certains résidus responsables du bon repliement de la protéine.¹⁹³⁻¹⁹⁵ La résultante est une protéine NPM1 qui ne transite plus et reste délocalisée au cytoplasme, d'où le nom NPM1c.¹⁹³ Ces leucémies sont invariablement associées à une forte signature HOX/MEIS/PBX (**Tableau 1.1**) quoique celle-ci varie des KMT2A par la régulation de plusieurs HOXB.¹⁹⁶ Considérant la diversité des fonctions cellulaires exercées par NPM1, les mécanismes directement responsables de la transformation sont difficiles à cerner.

Une hypothèse intéressante fait intervenir une interaction physique entre NPM1 et l'inhibiteur de l'élongation transcriptionnelle HEXIM1. Il a été rapporté qu'en présence de NPM1c, HEXIM1 était entraîné et séquestré au cytoplasme et donc incapable d'inhiber le complexe pTEFb.¹⁹⁷ Alors que cette idée est séduisante, 2 détails sont difficiles à réconcilier avec la signature HOX/MEIS/PBX. D'abord, l'étude montre que malgré la présence certaine de HEXIM1 au cytoplasme, la majorité de la protéine se trouve toujours au noyau. Ensuite, il est difficile de concevoir comment l'inactivation d'une protéine ayant une fonction aussi générale que l'inhibition de l'élongation puisse engendrer une réponse transcriptionnelle aussi spécifique. Une partie de la réponse pourrait venir d'une étude qui a identifié le gène *Pbx1* comme étant hypersensible à l'activité de pTEFb.¹⁹⁸ En effet, *Pbx1* a été l'un des 25 gènes dont les niveaux d'expression ont le plus diminué en réponse à une faible dose d'au moins deux inhibiteurs de pTEFb différents. La majorité des autres gènes cellulaires n'ayant pas été affectés, il est raisonnable de croire qu'une proportion marginale de gènes, dont HOX/MEIS/PBX, soit susceptible de répondre à une variation minimale de l'activité des régulateurs d'élongation. Cette hypothèse rejoint également le premier mécanisme suggéré pour expliquer le potentiel transformant des translocations KMT2A.

1.2.6.4 Translocations PICALM-MLLT10 et KAT6A-CREBBP

Le processus transformant induit par PICALM-MLLT10 (CALM-AF10) est imprécis. On rapporte toutefois que le potentiel oncogénique de cette fusion est inhibé par une inactivation génétique ou chimique de DOT1L.¹⁹⁹ Considérant que la portion MLLT10 préserve un domaine PHD dans la fusion, il est tentant de croire que la signature HOX/MEIS/PBX est également causée par la régulation de l'élongation. Finalement, le mécanisme de transformation de la fusion oncogénique KAT6A-CREBBP (MYST3-CBP) n'est pas connu.²⁰⁰ On y détecte toutefois un domaine de liaison à la chromatine (PHD) ainsi que des domaines acétyltransférases rappelant la voie de transformation de type « NUP98-PHD ».

1.2.6.5 Leucémies à faibles niveaux de HOX

Toutes les LMA ne présentent pas la signature HOX/MEIS/PBX. En effet, certaines mutations sont typiquement associées avec une expression faible des HOX. On note par exemple les leucémies avec la mutation bi-allélique de *CEBPA* ainsi que celles avec les mutations CBF (*inv(16)* et *RUNX1-RUNX1T1*).^{200,201} Ces leucémies présentent également un pronostic allant de très favorable à favorable selon une récente étude effectuée par l'ELN, supportant par corrélation négative les rôles néfastes de ces gènes à homéobox dans la survie des patients.¹¹ Il est intéressant de constater que des sites de liaison consensus pour *CEBPA* et *RUNX1* aient été trouvés dans la région promotrice de gènes comme *MEIS1*.⁹³ Alors que le mécanisme de répression de *MEIS1* pourrait sembler direct dans le cas de *RUNX1-RUNX1T1* par l'entremise du recrutement de corépresseurs, celui d'un double-mutant *CEBPA* qui ne peut plus lier l'ADN est moins évident et fait possiblement intervenir le produit de gènes normalement régulés par *CEBPA* ou une séquestration des autres facteurs *CEBP*.^{202,203}

1.2.7 Rôle des HOX et TALE dans le développement de leucémies

1.2.7.1 Études de gain de fonction

1.2.7.1.1 HOX et MEIS

Afin d'évaluer les conséquences d'une expression accrue des HOX dans l'hématopoïèse et leur rôle possible dans la leucémogénèse, une série d'études exploitèrent l'essai de reconstitution hématopoïétique décrit à la **Figure 1.2**. En accord avec leur niveau élevé d'expression dans les cellules souches et progénitrices, la surexpression des HOX testés prodigua un avantage prolifératif aux cellules progénitrices mais provoqua également le développement de leucémies. En effet, *Hoxa9*,²⁰⁴ *Hoxa10*,²⁰⁵ *Hoxb3*,²⁰⁶ *Hoxb6*,²⁰⁷ *Hoxb8*²⁰⁸ mais non *Hoxb4*,^{209,210} lorsque exprimés de manière ectopique dans la moelle de souris receveuses, ont tous contribué au développement de leucémies dont la morphologie dépendait de l'identité du HOX exprimé. Cette dernière constatation, en accord avec le rôle distinct des HOX au cours du développement embryonnaire, suggère qu'ils contribuent à la leucémogénèse à différents niveaux.²¹¹

Une investigation des mécanismes en cause permit de constater que certains HOX (A9, B6 et B4)^{207,209,212,213} contribuaient à l'expansion et l'auto-renouvellement des cellules souches. La longue période de latence précédant l'apparition des signes de maladie suggérait toutefois que des mutations additionnelles devaient être acquises pour accomplir une transformation complète.

Cette hypothèse fut rapidement supportée par l'observation d'une synergie entre l'expression ectopique concomitante des HOX et de leur cofacteur MEIS1. En effet, cette co-expression accéléra considérablement le développement de leucémies induit par HOXA2, HOXA4, HOXA9, HOXB3 et même HOXB4.^{204,210,214} Ces résultats rappellent la découverte du gène *Meis1* en tant que site de mutagenèse insertionnelle qui menait au développement de leucémies spontanées et qui corrélait étroitement avec une mutagenèse additionnelle dans les loci *Hoxa7* ou *Hoxa9*.²¹⁵ Au niveau des processus cellulaires affectés, il est suggéré que MEIS1 bloque la différenciation des cellules progénitrices tout en promouvant leur prolifération en réponse à divers stimuli.^{216,217} Il doit toutefois être souligné que MEIS1 est incapable d'induire le développement de leucémie lorsqu'exprimé seul dans la moelle de souris receveuses (sauf si fusionné à un domaine de transactivation constitutif (**Section 1.2.9**)). Il est donc probable que le programme de survie ou de prolifération de MEIS1 doive nécessairement être jumelé à un programme HOX d'auto-renouvellement et/ou de blocage de différenciation avant d'être complètement transformant.

1.2.7.1.2 Translocations impliquant les homéoprotéines

La découverte de translocations chromosomiques fusionnant de manière récurrente les HOX et leurs cofacteurs chez des patients supporte davantage l'hypothèse d'un rôle causal de ces protéines dans la leucémogénèse. La translocation E2A-PBX1 contient les domaines de transactivation d'E2A fusionnée avec PBX1, duquel manquent les 89 premiers acides aminés. E2A est essentiel à la maturation des progéniteurs lymphoïdes B et son patron d'expression correspond bien aux cellules immortalisées par la translocation.²¹⁸ Les mécanismes transformants sont encore imprécis mais on reconnaît l'importance du recrutement de coactivateurs transcriptionnels, comme CREBBP/P300,²¹⁹ ainsi que la séquestration de facteurs importants pour les fonctions de la protéine E2A de type sauvage. Le rôle joué par PBX1 dans les progéniteurs n'exclut toutefois pas une dérégulation de ses gènes cibles.²²⁰

Un groupe de 8 HOX différents (*Hoxa9*, *Hoxa11*, *Hoxa13*, *Hoxb9*, *Hoxc11*, *Hoxc13*, *Hoxd11* et *Hoxd13*) a été rapporté comme partenaires de fusion de NUP98. Ce type de translocation a déjà été abordé dans la section précédente. Nous ajouterons ici que le potentiel de transformation de quelques-unes de ces fusions (NUP98-HOXA9, NUP98-HOXA10 et NUP98-HOXD13) a été confirmé par des études de « gain-de-fonction » rétroviraux ou *knock-in*.²²¹⁻²²⁵ Il est intéressant de noter que toutes les translocations testées à ce jour collaborent également avec MEIS1 dans l'accélération du développement leucémique. Une fusion MSI2-HOXA9 a également été observée, juxtaposant 2 motifs de reconnaissance ARN à l'homéodomaine de

HOXA9. Même si aucune étude fonctionnelle n'a encore été rapportée à propos de cette translocation,²²⁶ on doit noter que MSI2 est maintenant reconnu comme un régulateur positif de l'auto-renouvellement des CSH.²²⁷ Finalement, la fusion TCR β -HOXA amène la région 5' distale des HOXA sous le contrôle du locus TCR β résultant en une surexpression des gènes HOXA10 et HOXA11.²²⁸ En résumé, ces études de gain de fonction dans des modèles expérimentaux murins ont permis de mettre en évidence la capacité des HOX et de leurs cofacteurs à initier et à maintenir un programme compatible avec le développement de cancer par la régulation de processus tels que l'auto-renouvellement, la prolifération et le blocage de la différenciation hématopoïétique. Les implications sont toutefois limitées par le système de transduction rétrovirale généralement employé qui induit l'expression de transcrits souvent au-delà des niveaux observés *in vivo*.

1.2.7.2 Études de perte de fonction

Cette section complète les études ci-dessus en évaluant le rôle des HOX et de leurs cofacteurs lors de la transformation cellulaire induite par divers oncogènes. On rapporte d'abord que l'expression de KMT2A-MLLT1 dans des cellules *Hoxa9*^{-/-} primaires n'induit pas de leucémies en transplantation congénique. Ce résultat soutient l'hypothèse d'une dépendance absolue de la fusion KMT2A à la présence du facteur HOXA9.²²⁹ À l'inverse, une souris *knock-in* KMT2A-MLLT3 induit le développement d'une leucémie myéloïde aigüe après la même période de latence indépendamment que la souris soit de type sauvage ou mutante *Hoxa9*^{-/-}.²³⁰ Alternativement, la fusion KMT2A-GAS7 induit des leucémies de sévérité et pénétrance altérées lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules *Hoxa7*^{-/-}, *Hoxa9*^{-/-} ou *Hoxa7*^{+/-}*Hoxa9*^{+/-}.¹⁰⁹ Outre la méthodologie distincte, les différences fonctionnelles observées dans ces 3 cas isolés pourraient s'expliquer par une dépendance variable à la présence des HOX qui serait déterminée par l'identité du partenaire juxtaposé. Il est effectivement possible que certaines translocations permettent une meilleure liaison de KMT2A au promoteur de *Hoxa9*. De plus, il faut noter que la leucémogénèse est plus rapide suite à l'expression des fusions KMT2A que d'un gène HOX. Ce résultat implique que d'autres facteurs critiques sont régulés par ces translocations et que cibler uniquement un gène HOX, ou même 2, ne serait pas suffisant pour traiter les leucémies KMT2A.

À partir des leçons tirées de l'analyse des souris HOX mutantes, il est possible que la transformation soit davantage ralentie par l'inactivation d'un cofacteur de HOX. Considérant

son potentiel dans l'accélération des leucémies HOX et le fait qu'il soit fréquemment surexprimé dans les leucémies KMT2A, MEIS1 représente par conséquent une cible intéressante. Dans cette optique, une étude a évalué le potentiel transformant de 6 translocations KMT2A (MLLT3, FOXO4, CENPK, EPS15, MLLT10 et MLLT1) en fonction des niveaux de MEIS1 et a révélé que la délétion de MEIS1 est suffisante pour prévenir la transformation des cellules primaires sur milieu semi-solide. Une forte corrélation a par ailleurs été établie entre le niveau d'expression de MEIS1 et l'agressivité des leucémies induites par les différentes translocations, suggérant que MEIS1 représente un médiateur essentiel et limitant à une grande proportion de fusions KMT2A.²³¹ Il est important de noter que cette fonction essentielle de MEIS1 dans le développement du cancer du sang a également été signalée dans des cellules primaires humaines contenant la mutation NPM1c. En effet, une baisse des niveaux de MEIS1 par shRNA a spécifiquement inhibé la prolifération en culture de trois leucémies primaires NPM1c.²³² Ces résultats suggèrent que MEIS1 représente une cible thérapeutique intéressante qui permettrait de traiter un large éventail de leucémies différentes.

Le cas des cofacteurs PBX est également intéressant. Dans les études de « gain-de-fonction » ci-dessus, la surexpression de PBX1 ne collabore pas avec les gènes HOX dans le développement de leucémies.²¹⁰ À l'inverse, les HOX ne transforment pas si leur domaine d'interaction avec PBX est muté, suggérant que ce dernier est également essentiel à la transformation sans toutefois être limitant.^{233,234} Récemment la co-expression ectopique de PBX3 et HOXA9 a démontré une collaboration dans l'accélération du développement leucémique.²³⁵ Il s'agit de l'un des premiers exemples d'une différence fonctionnelle entre PBX1 et PBX3. Ces résultats sont en accord avec l'observation que PBX3 est surreprésenté dans nos signatures HOX/MEIS/PBX et suggère qu'il pourrait aussi jouer un rôle de premier plan dans la leucémogénèse humaine.

Le phénotype général et le développement spontané de lymphomes observés chez la souris mutante *Prep1^{i/i}* a déjà été abordé dans la section précédente et pointait vers une fonction de suppresseur de tumeur. En effet, la perte de fonction partielle de PREP1 d'une souris hétérozygote est suffisante pour accélérer le développement de lymphomes dans les souris *EμMyc*.²³⁶ Ces lymphomes sont phénotypiquement plus précoces (pro-B) que ceux observés dans les souris *EμMyc-Prep1^{+/+}* (Pré-B, B). Ce changement est possiblement attribuable à la fonction et l'expression normale de PREP1 dans les compartiments primitifs de la lignée lymphoïde. La potentialisation de la transformation serait quant à elle reliée à l'instabilité génomique qui suit l'inactivation de PREP1.²³⁷ Cette hypothèse concorde avec sa sous-expression dans une grande

variété de tissus cancéreux humains.²³⁸ Ainsi malgré qu'il soit de la même famille que MEIS1, une protéine pro-leucémique, et qu'ils partagent une grande homologie de séquence, il semble que PREP1 ait évolué pour accomplir des fonctions cellulaires légèrement divergentes.

En somme, ces résultats sont en accord avec le rôle des HOX et de leurs cofacteurs dans le maintien et l'expansion des cellules souches et suggèrent que des programmes de régulation similaires surviennent dans les CSL. MEIS1 régule effectivement une série de gènes cibles associés aux CSH²³⁹⁻²⁴¹ et il a été montré que sa surexpression rétablissait le potentiel oncogénique de MN1 dans des cellules GMP bien engagées dans le processus de différenciation.²⁸ Il se pourrait par conséquent que MEIS1 puisse activer un programme transcriptionnel d'auto-renouvellement dans des cellules pré-transformées par d'autres oncogènes. En ce sens, une étude récente montra que la présence de MEIS1 et HOXA9 était requise même après la transformation cellulaire suggérant un rôle de maintenance dans les CSL.²⁴²

1.2.8 Dynamique des interactions TALE-HOX

Tel que mentionné plus haut, la séquence de l'homéodomaine est relativement bien conservée. La majorité des protéines HOX se lie faiblement *in vitro* à une séquence d'ADN consensuelle TAAT (*antp*) ou TTAT (*abd-b*).⁶⁴ Comment alors une famille de facteurs de transcription régulant un processus aussi complexe que le développement embryonnaire ou l'hématopoïèse peut-elle être discriminante pour une série de gènes cibles s'ils se lient tous à la même courte séquence. Une partie de la réponse est venue de l'interaction avec des cofacteurs, dont MEIS/PREP et PBX constituent les plus célèbres représentants. L'implication directe de ces cofacteurs dans le développement de cancers en fait des cibles intéressantes pour le développement d'inhibiteurs thérapeutiques. Beaucoup d'études furent nécessaires, utilisant principalement des techniques de retard sur gel et d'amplification exponentielle de sites de liaison *in vitro*, afin de comprendre la dynamique de ces interactions. J'en décrirai ici brièvement les éléments structuraux avant d'élaborer davantage sur les fonctions qui en découlent.

1.2.8.1 Structure des interactions HOX-TALE

1.2.8.1.1 Hétérodimère HOX-PBX

La ressemblance entre les phénotypes des mutants *exd* et *hom-c* chez la drosophile mena rapidement à la découverte d'une interaction protéine-protéine (IPP), qui s'est révélée être conservée chez les mammifères.^{243,244} Effectivement une association physique entre PBX1 et 6 HOX

différents des paralogues 1 à 8 a subséquemment été rapportée dans la littérature.²⁴⁵⁻²⁵⁰ Cette interaction requiert la présence d'ADN et des régions plus ou moins conservées chez PBX et les HOX. Du côté PBX, on rapporte l'importance du segment TALE et d'une séquence d'une douzaine de résidus en aval de l'homéodomaine (**Figure 1.5**). Du côté HOX, l'interaction requiert une séquence qui diverge légèrement entre les paralogues mais qui contient invariablement un tryptophane (W). La séquence conservée en aval de l'HD de PBX1, qui n'est pas structurée en solution, va former une quatrième hélice alpha lorsque l'HD entrera en contact avec l'ADN. Cette hélice additionnelle interagira avec les hélices 1 et 3 pour former une structure de style globulaire. La séquence HOX contenant le résidu tryptophane entrera ensuite en contact avec une partie de l'hélice 3, la séquence TALE (PYP) et une portion du C-terminal conservé.⁶⁹

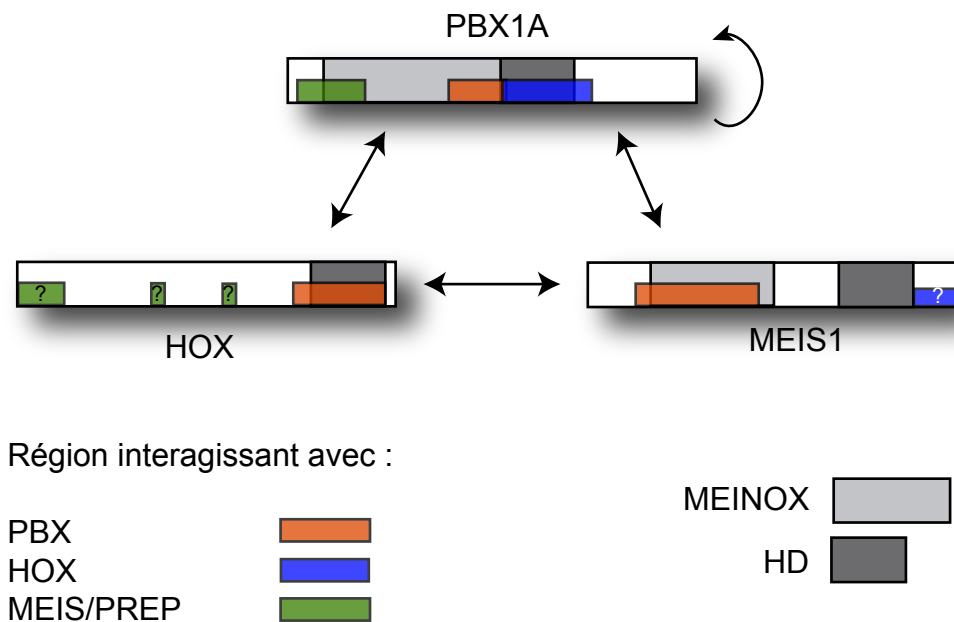


Figure 1.5 Interaction HOX-TALE.

Schématisation des interactions et des domaines impliqués pour chaque protéine. La région gris-pâle représente le domaine ancestral MEINOX (PBC ou HM) tandis que la région gris-foncé représente l'homéodomaine.

Le segment contenant le tryptophane varie légèrement d'un HOX à l'autre, allant de TFDWMK (HOXA1), à IYPWMR (HOXA5) pour se rendre à AANWLH (HOXA9). Les conséquences de ces associations HOX-PBX de façon générale consistent en l'augmentation de l'affinité du complexe pour l'ADN ainsi qu'une plus grande spécificité des sites contactés par les HOX. En effet,

on observe une évolution des demi-sites HOX lorsque dimérisés à PBX qui se fait en partie par l'entremise de la portion N-terminale de l'HD HOX. Dans l'ordre antérieur vers postérieur: TGAT → TAAT → TTAT.²⁵¹ De plus, un HOX donné a la capacité de lier la séquence reconnue par un HOX antérieur. Ainsi, HOXA9 est capable de lier les 3 séquences ci-dessus tandis que HOXA1 ne peut lier que TGAT. À cela s'ajoute le fait que HOXA9-PBX reconnaît sa séquence TTAT avec 20 fois plus d'affinité que HOXA1-PBX pour TGAT. Ensemble ces données fournissent une explication moléculaire au phénomène de prévalence postérieure. En se liant à un seul cofacteur, les HOX acquièrent une spécificité et une affinité variable qui, ajouté à tous les autres mécanismes déjà mentionnés, contribuent à définir l'identité cellulaire.²⁵² De son côté, le site de liaison à l'ADN de PBX demeure inchangé, qu'il soit couplé à un HOX ou non (TGAT), suggérant que la variété du programme transcriptionnel dépend de l'identité du HOX.

1.2.8.1.2 Hétérodimère HOX-MEIS/PREP

Les HOX des paralogues 11-13 n'ont pas de tryptophane conservé et n'interagissent pas avec PBX. Par conséquent, il est possible qu'un second cofacteur puisse, à l'instar de PBX, stabiliser et augmenter la spécificité des interactions HOX-ADN des paralogues postérieurs. En se basant sur les corrélations génétiques observées entre HOX et MEIS, il fut suggéré que MEIS soit également un cofacteur. L'hypothèse est certainement raisonnable mais fut difficile à prouver. À ce jour, seulement 2 articles supportent l'hypothèse d'une interaction directe en présence d'ADN entre MEIS1 et HOXA9/ HOXD9.^{253,254} Par ailleurs, les domaines impliqués dans l'IPP se sont révélés difficiles à cerner. On propose des résidus des domaines C-terminaux divergents de MEIS1A et MEIS1B ainsi que 2 domaines en N-terminal de l'HD des HOX (**Figure 1.5**). De plus, aucune interaction entre les HOX et PREP n'a été détectée.²⁵⁵ Ces résultats suggèrent que si interaction il y a entre MEIS et HOX, elle est définitivement moins robuste que PBX-HOX.

1.2.8.1.3 Hétérodimère PBX-MEIS/PREP

La mise à jour des interactions physiques et génétiques des pairs HOX-PBX et HOX-MEIS mena rapidement à la découverte d'une nouvelle interaction entre MEIS et PBX, ajoutant du même coup un niveau supplémentaire de régulation. Les domaines responsables furent cartographiés aux 89 premiers résidus de PBX qui sont perdus dans la translocation E2A-PBX1 et qui chevauchent le N-terminal et le début du domaine PBC. Du côté de MEIS, de courtes séquences riches en leucine dans les sous-domaines HM^A et HM^B contribuent à l'IPP (**Figure 1.5**), possiblement par une interaction de type « coiled-coil ». Contrairement à l'interaction HOX-PBX, le

dimère MEIS-PBX ne requiert pas d'ADN.^{71,239,256} De ce fait, PREP1, qui possède également un domaine HM, est aussi un partenaire de PBX.²⁵⁷ Cette interaction est aussi détectée chez la drosophile entre les homologues *exd* et *hth*, reflétant la pression de sélection exercée pour préserver les fonctions de ce dimère.⁹¹

1.2.8.1.4 Hétérotrimère HOX-PBX-MEIS/PREP

La dynamique de ces associations pourrait être restrictive, la présence de l'une empêchant l'occurrence de l'autre. Alternativement plus d'une de ces interactions pourraient survenir simultanément, une hypothèse en accord avec l'utilisation de domaines non-chevauchants dans les interactions HOX-TALE et TALE-TALE. En ce sens, la formation d'un complexe trimérique comprenant une molécule HOX, PBX et MEIS (ou PREP) a été observée *in vitro* et *in vivo*.^{254,255,258,259} La structure de ce trimère peut alterner entre une entité MEIS ou PBX recrutée à un dimère PBX-HOX ou MEIS-HOX lié à l'ADN. Alternativement, un trimère peut également se former où les 3 protéines contactent l'ADN. Dans cette configuration, MEIS1 est relié au dimère PBX-HOX par l'entremise de PBX. Curieusement, seule cette dernière configuration démontra une activité transcriptionnelle *in vitro*, possiblement due à l'utilisation d'une séquence régulatrice retrouvée naturellement dans le génome (HOXB2-R4 et HOXB1 ARE) plutôt qu'une séquence consensus permettant uniquement la liaison d'un dimère. Curieusement, une mutation empêchant la liaison à l'ADN dans l'HD (N51) du partenaire « recruté » stimule l'assemblage du trimère sur le site consensus.²⁵⁸ Ce résultat suggère que le dimère et les sites d'ADN avoisinants compétitionnent pour l'interaction avec le troisième membre. Si un site reconnu par ce dernier se trouve à proximité, le complexe pourrait adopter une configuration active, ou modulable, permettant la transcription de gènes cibles. En somme, l'assemblage de ce complexe trimérique offre également une nouvelle possibilité de spécificité de liaison à l'ADN.

1.2.8.1.5 Homodimère PBX-PBX

Pour boucler la boucle, une interaction entre les membres de la classe PBX a également été observée. Deux articles ont effectivement rapporté en utilisant la technique de retardement sur gel la présence d'homodimères PBX.^{250,260} Les patrons de bandes retardées suggèrent que les membres PBX1A, PBX1B et PBX3 sont tous capables de lier une séquence PBX spécifique TGATTGAT en interagissant avec eux-mêmes mais aussi entre eux (par exemple, PBX1A-PBX3), supportant un domaine d'interaction conservé chez toute la classe PBC, probablement situé dans la portion en amont de l'HD.²⁶¹ Les conséquences de cette interaction sur l'hétéro-

dimérisation avec les partenaires HOX ou MEIS ainsi que sur le rendement transcriptionnel des gènes cibles ne sont pas encore connus.

1.2.8.2 Fonctions des interactions HOX-TALE et TALE-TALE

Les interactions HOX-TALE dimériques ou trimériques offrent plusieurs niveaux de régulation de l'activité des HOX. Elles permettent notamment de discriminer les sites de liaison d'ADN, de stabiliser le complexe tout en modulant l'activité transcriptionnelle. Les mécanismes sous-tendus par cette dernière fonction commencent à être mieux connus.

1.2.8.2.1 Régulation de la localisation nucléaire de PBX

Il est rapporté que l'activité de la protéine PBX dans l'établissement de l'identité proximo-distale des membres en développement coïncide avec sa localisation nucléaire, suggérant un mode de régulation post-traductionnel.²⁶²⁻²⁶⁴ Une étude chez la drosophile démontra que la localisation nucléaire de *exd* dépendait de la présence dynamique de *hth*, possiblement par l'entremise de leur association en hétérodimère.⁹¹ Plusieurs mécanismes permettant de réguler la présence nucléaire de PBX ont depuis été caractérisés.

(1) D'abord, tel que soupçonné, l'hétérodimérisation avec les membres de la classe MEIS provoque un changement de conformation de PBX qui expose les 2 signaux de localisation nucléaire (SLN) de l'homéodomaine tout en masquant les 2 signaux d'exportation nucléaire (SEN) du domaine PBC^A. En l'absence de MEIS/PREP, une interaction intramoléculaire connecte le domaine N-terminal à l'HD de PBX et induit une conformation en forme de pince qui rend inaccessible les SLN. À noter qu'on retrouve également des SLN dans les protéines MEIS mais non dans PREP. Ces derniers dépendent par conséquent des PBX pour leur propre localisation nucléaire.²⁶⁵⁻²⁶⁷

(2) Un mécanisme de rétention cytoplasmique implique une interaction avec MYH10. Cette myosine localisée dans le cytosol compétitionne MEIS pour l'interaction avec le domaine PBC^B. Ainsi, en l'absence de MEIS1, dont l'expression est souvent transitoire et tissu-spécifique, PBX colocalise avec MYH10.²⁶⁸

(3) Finalement, il y a également une rétention nucléaire indépendante de MEIS/PREP qui fait intervenir la phosphorylation du domaine PBC^B par la kinase PKA. Une surexpression de la sous-unité catalytique de PKA, ou une augmentation des niveaux d'AMPc par un traitement à la forskoline, favorise la rétention nucléaire de PBX en contrebalançant l'interaction des deux SEN avec l'exportine XPO1.²⁶⁷

1.2.8.2.2 Modification de la chromatine

Il a récemment été suggéré que les protéines TALE puissent servir de balises transcriptionnelles.²⁶⁹ Par exemple, un dimère PBX-MEIS pourrait se lier à la chromatine près de gènes impliqués dans la différenciation et, en réponse aux stimuli cellulaires appropriés, recruter des facteurs additionnels pour induire une conformation permissive prête à l'activation transcriptionnelle. Selon ce modèle, la liaison du dimère TALE précéderait l'arrivée des facteurs de transcription tissus-spécifiques. Ce phénomène a également été observé chez le *xenopus* où PREP, puis MEIS et PBX sont séquentiellement recrutés au promoteur HOXB, mais où l'activation transcriptionnelle ne démarre que lorsque HOXB est lié au complexe.²⁷⁰

Deux séries d'études supportent un tel modèle. D'abord, il a été montré que PBX1 et MEIS1 interagissaient avec des corépresseurs (HDAC1/3, NCOR1/2 et SIN3B) et des coactivateurs (CRTC, CREB1, CBP), respectivement.^{106,261,271-273} De plus, la fonction transactivatrice de MEIS1 est stimulée par la forskolin, la trichostatin A et par l'expression ectopique de PKA, suggérant que cette activité est sensible aux stimuli environnementaux. Ce simple modèle doit déjà composer avec plusieurs mécanismes de régulation supplémentaires comme l'interaction des HDAC avec des isoformes spécifiques de PBX de même que la compétition interne entre MEIS1 et les HDACs pour lier le même domaine sur PBX.^{106,274} La deuxième série d'études rapportent une interaction PPI entre les TALE et une variété impressionnante de facteurs de transcription souvent tissus-spécifiques. En effet, MYOD,²⁶⁹ PAX6,^{275,276} PDX1,²⁷⁷ POU2F1,²⁷⁸ STAT5,²⁷⁹ ETS1,²⁸⁰ YAP1,²⁸¹ SMAD2/3/4,²⁸² CEBPA/B,^{279,283} TFAP4,²⁸⁴ TLX,²⁸⁵ et OTX2²⁸⁶ ont tour à tour été révélés comme interacteurs de PBX et/ou de MEIS/PREP. En somme, ces données supportent un rôle de facilitateur transcriptionnel pour les TALE mais n'exclut pas le potentiel de « refermer » la chromatine si les voies signalétiques le dictent.

1.2.8.2.3 Régulation de gènes cibles

Les études pionnières mentionnées ci-haut ont décortiqué les interactions HOX-TALE en se basant principalement sur des techniques *in vitro* de retard sur gel et l'utilisation de protéines recombinantes sur des séquences d'ADN consensus. L'identification concomitante de gènes cibles tels que *CYP17*,²⁸⁷ *PLAU*,²⁵⁷ *HIF1a*,²⁸⁸ *HOXB1* et *HOXB2*,^{234,255,259,289} de même que *SOX3*²⁹⁰ permit l'étude de ces IPP sur des cibles pertinentes *in vivo*. Après coup, on constate que l'utilisation des séquences consensuelles comme sites de liaison masquait la grande flexibilité des homéodomaines qui démontrent différentes affinités pour une variété de sites plutôt qu'une affinité

maximale envers un motif dit consensus.⁷⁰ Afin de disséquer les réseaux transcriptionnels ayant cours lors du développement leucémique, plusieurs études, incluant les travaux présentés ici, ont tenté d'identifier les gènes modulés par MEIS1. Plusieurs candidats pertinents tels que *MYB*,²⁴⁰ *FLT3*,²³⁹ *TRIB1/2*,²⁹¹ *CCND3*²⁴¹ et *CCL3*²⁹¹ furent identifiés et certains se sont révélés essentiels au processus leucémogénique sans cependant être suffisants pour récapituler les fonctions de MEIS1. Ces résultats suggéraient une action concertée de plusieurs cibles différentes.^{240,292}

Les études d'immunoprécipitation de chromatine couplée au séquençage à haut débit (ChIP-seq) permirent de dresser un portrait plus complet des interactions MEIS1-ADN. Une première étude compara le patron de liaison de 10 facteurs de transcription, dont MEIS1, dans des cellules hématopoïétiques progénitrices. Sur 8000 sites de liaison identifiés pour MEIS1, seulement 10% correspondait à des sites localisés près de séquences promotrices, le reste se partageant entre des régions intra- et inter-géniques.²⁹³ Cette préférence pour des sites éloignés fut confirmée dans un contexte leucémique de surexpression de HOXA9+MEIS1, où 95% des sites liés par le dimère se trouvaient dans des régions intra- ou inter-géniques. Ces sites portaient également une signature épigénétique correspondant à des séquences amplificatrices (H3K4me1+CREBBP+H3/H4Ac).²⁷⁹ Ces deux études rapportent également la présence fréquente de plusieurs autres facteurs de transcription sur une même région et supportent la notion que les TALE participent à la spécification de l'identité cellulaire en collaboration avec une grande variété de facteurs de transcription.

On rapporte finalement une association distincte de MEIS1 et PREP1 avec PBX1 lorsque couplés à l'ADN au cours de l'embryogenèse. Effectivement, les sites liés par les hétérodimères PREP1-PBX correspondent surtout aux séquences près des sites d'initiation transcriptionnelle (TSS). En revanche, les sites reconnus par les hétérodimères MEIS1-PBX se situent, à nouveau, dans les régions intra- et inter-géniques éloignées. On doit mentionner que la majorité des sites de liaison de MEIS1 (85%) était reconnue par une entité monomérique, suggérant un mode d'action différent et encore inexploré pour cette homéoprotéine.²⁹⁴

1.2.9 Domaines de MEIS1 importants pour la transformation

Par des approches de gain-de-fonction, plusieurs domaines de la protéine MEIS1 se sont révélés importants à son activité dans l'accélération de la leucémogénèse.^{106,231,239,291,295,296} Ainsi, un mutant MEIS1 dont le domaine HM est excisé a un potentiel d'accélération leucémique diminué d'environ 50% lorsque surexprimé avec HOXA9, suggérant que l'association physique

avec PBX est requise pour cette fonction. Afin de confirmer cette hypothèse, il a été montré qu'un mutant MEIS1 dont le domaine HM est remplacé par le domaine PBC était capable de collaborer avec HOXA9 mais seulement en présence d'un mutant PBX contenant la substitution réciproque. Ce résultat suggère que la permutation des domaines permet de reconstituer l'interaction physique entre MEIS et PBX et démontre l'importance de cette association dans la transformation initiée par les HOX. Cette information supporte également la notion que les PBX sont essentiels mais non limitants dans les modèles hématopoïétiques tel que discuté plus haut.

On rapporte en deuxième lieu la nécessité de MEIS1 à lier l'ADN par l'entremise de son homéodomaine (HD). L'ablation du HD favorise l'association de MEIS1 en trimère avec les homodimères HOX-PBX mais il semblerait que la liaison de MEIS1 à ses sites cibles soit requise pour le développement de LMA. En revanche, il a été montré que cette propriété était moins requise pour l'accélération des leucémies induites par la translocation NUP98-HOXA10 et NUP98-HOXD13.²²⁵ Cette distinction supporte la notion qu'un produit de translocation est généralement impliqué dans la régulation de plusieurs gènes cibles et qu'une partie du programme transcriptionnel de MEIS1 soit déjà prise en charge par NUP98-HOXA10 et NUP98-HOXD13.

Finalement on rapporte un rôle essentiel pour le domaine C-terminal en aval de l'HD dans l'accélération des leucémies HOX. L'activité transcriptionnelle de MEIS1 réside dans cette séquence polypeptidique et il a été montré que sa substitution par un domaine de transactivation constitutif tel que VP16 non seulement récapitulait le phénotype leucémique en collaboration avec HOXA9 mais prodiguait également des propriétés transformantes intrinsèques à MEIS1.^{295,296} Également, la substitution de cette région par un domaine répresseur transcriptionnel comme M33 ou *Engrailed* est suffisante pour perdre le potentiel leucémogénique de MEIS1.²⁴¹ Ces importantes découvertes démontrent que la régulation de l'activité transcriptionnelle du domaine C-terminal est centrale au processus leucémogénique. En ce sens, une stimulation par l'expression de la protéine PKA ou par la forskolin, deux médiateurs de la réponse à l'AMPc est requise et suffisante pour déclencher une réponse transcriptionnelle de MEIS1 *in vitro*.¹⁰⁶ Il a ensuite été montré que l'expression de MEIS1 altérait la réponse des cellules HOXA9 suite à l'exposition à certaines cytokines,²¹⁶ suggérant que cette régulation de l'activité transcriptionnelle de MEIS1 pouvait se faire en réponse à des facteurs mitogéniques. Le recrutement de CREB1 via une interaction avec les coactivateurs CRTC a été proposé comme mécanisme.²⁷³ De plus l'apposition de VP16 sur HOXA9 permet également d'augmenter la transformation

cellulaire en culture, suggérant que l'apport d'une activité constitutive de transcription par l'un ou l'autre des membres du complexe HOX/MEIS/PBX est critique à leur fonction dans le développement de leucémies.²³⁴

En somme, une revue de la littérature montre que les HOX et leurs cofacteurs sont non seulement anormalement exprimés dans les cellules leucémiques humaines mais qu'ils contribuent également de manière active, coopérative et directe au développement de la maladie. Leur signature transcriptionnelle est répandue au sein de plusieurs sous-types de leucémies et suggère un mécanisme de transformation similaire.

1.3 Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

Le BRET, pour transfert d'énergie de résonance de bioluminescence, est une élégante technique qui permet la visualisation des interactions protéines-protéines (IPP) dans des cellules vivantes et en temps réel. De façon générale, il s'agit d'une technique qui tire avantage d'un transfert d'énergie non-radiatif d'une molécule fluorescente à une autre. Elle nécessite à cet effet une forte proximité entre les deux molécules, signifiant qu'elle peut être exploitée pour détecter des interactions physiques.

1.3.1 Prérequis techniques pour un RET

Pour que le transfert d'énergie de résonance (RET) survienne, plusieurs conditions doivent être rassemblées. D'abord, les molécules ne peuvent se trouver à plus de 100 Å, ou 10 nm, l'une de l'autre. Ensuite, le spectre d'émission de la molécule dite « donneuse » et le spectre d'excitation de la molécule dite « acceptrice » doivent se chevaucher. Finalement, le transfert ne peut s'effectuer que si l'orientation des dipôles est appropriée. Malgré ces restrictions, il est possible de fusionner ces molécules à deux protéines différentes afin d'en déterminer la proximité ou l'interaction. À ce jour, trois des protéines fluorescentes naturelles découvertes chez la méduse *Aequorea victoria* et chez l'anémone *Discosoma striata*, ont été dérivées en de multiples mutants démontrant un large éventail de propriétés fluorescentes distinctes et couvrant une grande proportion du spectre lumineux.²⁹⁷ Ces modifications offrent une grande variété de combinaisons possibles pour des applications telles que la microscopie et la cytométrie de flux.

1.3.2 Applications biotechnologiques

L'application la plus directe de ces découvertes consiste à fusionner deux protéines fluores-

centes, typiquement la « Cyan Fluorescent Protein » (CFP) et la « Yellow Fluorescent Protein » (YFP) à deux facteurs d'intérêt et d'exciter la CFP par une source lumineuse (fluorescence) avant de détecter, en cas d'interaction, l'émission générée par la YFP. Cette technique puissante appelée FRET, pour « Fluorescence Resonance Energy Transfer, montrait toutefois quelques limitations. On note par exemple la possibilité d'exciter directement la molécule accepteuse par la source lumineuse et ainsi fausser le signal détecté. Ensuite, comme avec toute utilisation de la fluorescence, il y a le phénomène de photoblanchiment où, suite à une trop longue exposition ou à des excitations répétées, la molécule donneuse perd graduellement de son activité.

Il a été observé en 1962 que ce RET survenait naturellement chez certains organismes comme *Aequorae*.²⁹⁸ En effet, ils découvrirent qu'en plaçant la GFP en présence de la protéine Aequorin, son spectre d'émission décalait vers les longueurs d'onde plus élevées. D'autres organismes démontrant de telles propriétés ont été identifiés, comme la *Renilla reniformis* où l'excitation de la protéine fluorescente était provoquée par une réaction enzymatique d'une protéine bioluminescente. On catégorisa ces enzymes sous le terme « luciférase » et leur substrat sous le terme « luciférine ». ²⁹⁹ L'idée d'harnacher ce concept pour contrer le photoblanchiment du FRET revient à l'équipe du Dr Carl Johnson en 1999.³⁰⁰ Ils fusionnèrent deux protéines du cycle circadien bactérien (KaiA et KaiB) à la luciférase de *Renilla* (RLUC) et à la YFP. Après addition de coelenterazine, le substrat de la RLUC, directement sur les bactéries, ils détectèrent un pic d'émission de la GFP à la même longueur d'onde que si elle avait été excitée par la lumière. Ce résultat suggérait que les deux protéines fusionnées avaient performé un RET à partir d'une réaction enzymatique. Ainsi naquit le BRET. Ce qu'on appelle le signal BRET, ou le ratio BRET, correspond au signal GFP (luminescence) rapporté au signal de la luciférase (**Figure 1.6**). En combinaison avec le signal GFP (fluorescence), ces mesures permettent de contrôler pour la quantité relative de chaque partenaire.

Plusieurs IPP ont par la suite été confirmées et caractérisées grâce au BRET. On note à titre d'exemple la dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), largement considérés jusque alors comme monomères.³⁰¹ De par la simplicité de cette technologie et de la nature modulaire de ces constituants, plusieurs autres applications ont pu être développées. En effet, il a été montré qu'il est possible de fusionner chaque moitié de la séquence YFP à deux partenaires différents et de reconstituer la propriété fluorescente de la YFP lorsque ces derniers interagissent (BiFC, pour « Bimolecular Fluorescence Complementation»). En combinant cette propriété au

BRET, il devient possible en ajoutant un troisième partenaire, celui-ci fusionné à la LUC, de détecter un signal BRET spécifique à la formation d'un complexe trimérique (BiFC-BRET).³⁰² On signale également la possibilité de détecter des signaux BRET *in vivo* de même que la création de biocapteurs sensibles à certains événements d'une cascade signalétique.^{303,304}

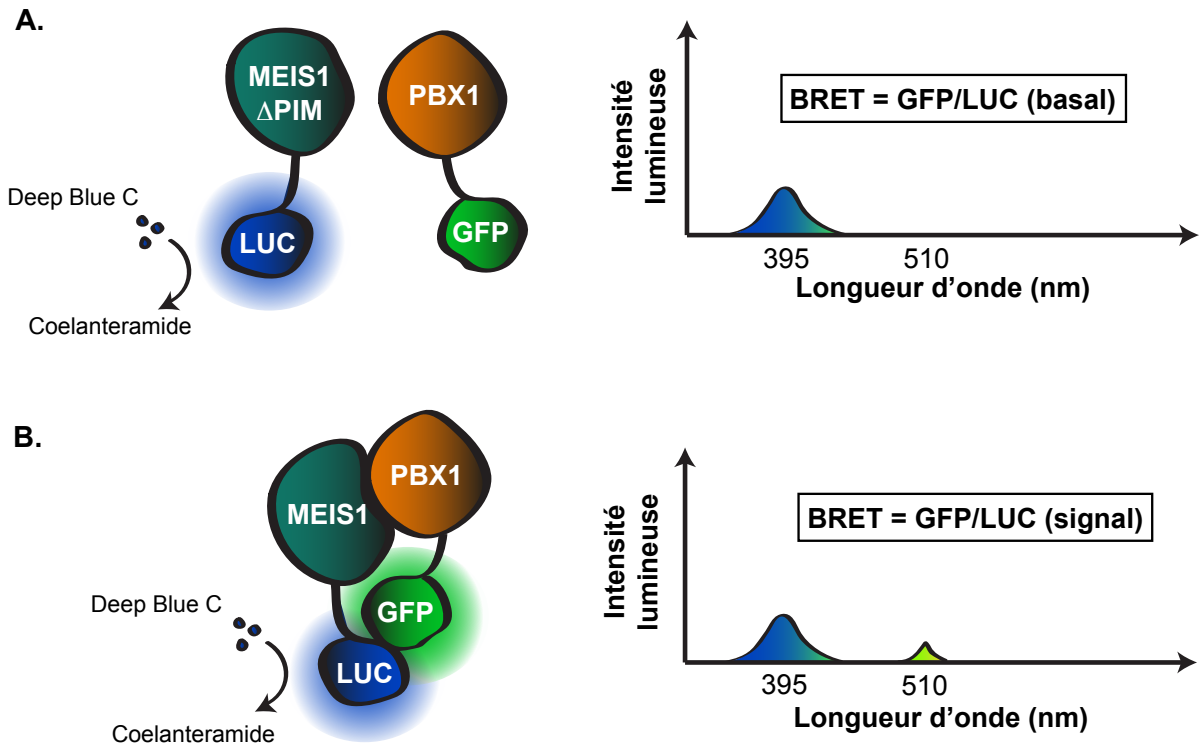


Figure 1.6 Illustration schématique décrivant le principe du BRET.

A) En cas d'absence d'interaction entre deux protéines fusionnées au duo donneur-accepteur, l'ajout de coelanterazine (Deep Blue C), résulte en un signal unique émis par la luciférase. B) Lorsque les deux biosenseurs sont à proximité, l'émission d'énergie lumineuse par la luciférase suite à l'ajout de la coelanterazine excite la molécule GFP et provoque un signal d'émission GFP-spécifique. Le ratio du signal GFP/LUC détermine le signal BRET qui reflète une IPP spécifique.

Et finalement, il est possible d'évaluer les conséquences de l'addition de molécules chimiques sur une IPP, comme il a été effectué sur l'interaction TP53-MDM2.³⁰⁵ À cet égard, l'essai BRET est également adaptable au criblage de molécules chimiques afin de découvrir rapidement de nouveaux inhibiteurs ou activateurs d'IPP dans des cellules vivantes.³⁰⁶

Les travaux présentés dans cette thèse visent à approfondir les fonctions exercées par deux domaines de MEIS1 : le domaine C-terminal et son domaine HM. Une première section évalue le potentiel de transformation du domaine C-terminal lorsque explanté sur le suppresseur de tumeur PREP1. Une deuxième section rapporte le développement d'un essai en BRET permettant de suivre l'interaction MEIS-PBX. Cet essai sera exploité pour identifier des molécules capables d'antagoniser cette dimérisation. Finalement, des expérimentations protéomiques ont permis l'identification de partenaires potentiels de MEIS1 et PREP1 qui suggèrent l'accomplissement de nouvelles fonctions par ces homéoprotéines.

CHAPITRE 2. C-terminal domain of MEIS1 converts PKNOX1 (PREP1) into a HOXA9-collaborating oncoprotein

Richard Bisailon¹, Brian T. Wilhelm¹, Jana Kros¹ and Guy Sauvageau^{1,2,3,*}

¹Laboratory of Molecular Genetics of Stem Cells, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ²Faculty of Medicine, Montreal, QC, Canada; ³Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada

***Corresponding author:**

Guy Sauvageau, M.D., Ph.D., Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

Article publié dans la revue Blood 2011 Oct 27;118(17):4682-9; PMID:21900201

2.1 Contribution des co-auteurs

Le chapitre 2 fait suite à un article auquel j'ai modestement contribué à mon arrivée dans le laboratoire et qui révélait l'importance de 3 domaines de MEIS1 dans son activité leucémogénique. Le travail présenté ici fait suite à cet article et démontre que le C-terminal de MEIS1 est capable de rendre PREP1 transformant en collaboration avec HOXA9.

RB: Design expérimental, réalisation des expériences, analyse des données, rédaction du manuscrit.

BTW: Design expérimental (Figure 2.5), réalisation des expériences (25% Figure 2.5)

JK: Rédaction du manuscrit (50%)

GS: Design expérimental, supervision de la rédaction

2.2 Résumé

Les membres MEIS1 et PKNOX1 (PREP1) de la superclasse des homéoprotéines TALE (Three Amino acid Loop Extension) partagent la capacité d'interagir avec les co-régulateurs PBX et HOX en plus de lier des séquences similaires d'ADN mais semblent jouer des rôles opposés dans le développement de cancer. Des niveaux d'expression élevés de MEIS1 accélèrent le développement de leucémies induit par les gènes *Hox* ou les translocations MLL et cette activité pro-tumorale a été associée à une fonction activatrice de la transcription. À l'opposé, une réduction des niveaux de PKNOX1 est associée au développement de cancers et ce, malgré l'absence apparente d'un domaine de transactivation. Dans cette étude, nous montrons qu'une protéine chimérique constituée du domaine C-terminal de MEIS1 fusionné en C-terminal de PKNOX1 (PKNOX1-MC) a le potentiel d'accélérer le développement des leucémies *Hoxa9* dans un modèle murin de reconstitution hématopoïétique. L'analyse transcriptomique de cellules primaires de moelle osseuse transduites par *Hoxa9+Meis1* ou *Hoxa9+Pknx1-MC* a révélé des perturbations dans des voies fonctionnelles communes telles que l'organisation de la chromatine et la régulation du cycle cellulaire. Ensemble, les résultats présentés ici suggèrent que le domaine C-terminal de MEIS1 confère à PKNOX1 une activité ectopique de transactivation qui promeut la leucémogénèse en régulant l'expression de gènes impliqués dans l'accessibilité de la chromatine et la progression du cycle cellulaire.

2.3 Summary

The three-amino-acid loop extension (TALE) class homeodomain proteins MEIS1 and PKNOX1 (PREP1) share the ability to interact with PBX and HOX family members and bind similar DNA sequences, but appear to play opposing roles in tumor development. Elevated levels of MEIS1 accelerate development of HOX- and MLL-induced leukemias, and this pro-tumorigenic property has been associated with transcriptional activity of MEIS1. In contrast, reduction of PKNOX1 levels has been linked with cancer development despite the absence of an identifiable transactivating domain. In this report we show that a chimeric protein generated by fusion of the MEIS1 C-terminal region encompassing the transactivating domain with the full length PKNOX1 (PKNOX1-MC) acquired the ability to accelerate the onset of *Hoxa9*-induced leukemia in mouse bone marrow transduction/transplantation model. Gene expression profiling of primary bone marrow cells transduced with *Hoxa9 + Meis1*, or *Hoxa9 + Pknox1-MC* revealed perturbations in overlapping functional gene subsets implicated in DNA packaging, chromosome organization and in cell cycle regulation. Together, results presented in this report suggest that the C-terminal domain of MEIS1 confers to PKNOX1 an ectopic transactivating function that promotes leukemogenesis by regulating expression of genes involved in chromatin accessibility and cell cycle progression.

2.4 Introduction

There is a compelling body of evidence implicating the HOX transcription factors and their co-factors PBX and MEIS/PKNOX(PREP) in leukemogenesis (reviewed by Argiropoulos and Humphries¹). In particular, de-regulated expression of *HOXA9* has been detected in a large proportion of human acute myeloid (AML) and lymphoid leukemias (ALL)²⁻⁵ and is associated with poor prognosis for refractory AML.² A significant proportion of these leukemias, especially those harbouring *MLL* rearrangements, also over-express *MEIS1*,³⁻⁶ indicating that activation of *MEIS1* may represent a key collaborating genetic event in leukemia development.

MEIS1 is a member of the TALE class of homeoproteins which includes the PBX and MEIS/PKNOX protein families characterized by an atypical homeodomain (HD) containing a three-amino acid loop extension (TALE) between the first two α -helices.⁷ MEIS1/PKNOX1 and PBX1 proteins physically interact with each other using the bipartite Homothorax-MEIS domain (HM^A/HM^B) and the PBC-A domain of PBX.^{8,9} This interaction was reported to enhance the stability of the heterodimers and to promote their nuclear localization.¹⁰⁻¹² MEIS1 and PBX1 also form heterodimers with HOX proteins in a DNA-dependent manner, and have been reported to form triple complexes comprising MEIS1/PKNOX1, PBX1 and HOX in both a DNA-independent^{13,14} and DNA-dependent manner,¹⁵ suggesting that in some cellular contexts a triple HOX–PBX–MEIS/PKNOX complex is required for HOX-mediated gene regulation.^{15,16} The combinatorial diversity generated by 39 different *Hox*, 3 *Meis*, 2 *Pknox* and 4 *Pbx* gene products likely enables formation of distinct regulatory complexes targeting numerous genomic loci in a cell context-dependent manner.

Using a bone marrow transduction/transplantation-based experimental model we showed that over-expression of *Meis1* significantly accelerates the onset of *Hoxa9*-induced AML,^{17,18} and similar collaborative *Meis1* effects were reported for other *Hox* and *Hox*-fusion genes tested.^{19,20} High levels of *Meis1* expression also appeared to be the rate-limiting factor for development of *Mll*-induced leukemias,²¹ implying that *Meis1* activity is necessary to create and/or maintain cellular context required for tumor development. *Pknox1* over-expression, in contrast, failed to accelerate but rather slightly delayed the occurrence of *Hox9*-induced AML.¹⁸ Supporting the possibility that PKNOX1 exerts tumor suppressive activity, Longobardi et al.²² reported that *Pknox1* deficiency creates a tumor-prone phenotype and accelerates E μ *Myc* lymphomagenesis.

Structural and functional analyses identified three distinct MEIS1 domains required for

leukemogenesis, namely the PBX-interacting domain comprising the HM^A/HM^B motifs, the DNA binding homeodomain (HD) and the C-terminal domain (CTD).²³⁻²⁵ The HD and HM^A/HM^B have been highly conserved during evolution of MEIS and PKNOX families. In contrast, the regions separating their HM^A/HM^B and the HD, and most notably their C-termini, are highly divergent. The CTD of MEIS1 is required for its transcriptional and transforming activity.^{23,24} Observations that the transactivating domain of VP-16 can rescue both the transactivating and the transforming functions in MEIS1 mutants lacking the CTD^{23,24} lends further support to the model predicting that the transforming function of MEIS1 reflects its ability to actively participate in regulation of gene expression. An equivalent trans-activating domain of PKNOX1 has not yet been identified, but genetic evidence demonstrates requirement for PKNOX1 in positive regulation of *Hox*,²⁶ TALE,²⁷ somatostatin²⁸ and follicle-stimulating hormone²⁹ gene expression.

We postulated that the proposed opposing roles of MEIS1 and PKNOX1 in leukemogenesis map to their distinct carboxy termini. To test this hypothesis we generated fusion PKNOX1 proteins comprising MEIS1 CTD, in the presence or absence of the PKNOX1 CTD, and tested their transforming functions in the *in vivo* leukemia-initiating assays. In this report we demonstrate that MEIS1 CTD confers to PKNOX1 the ability to accelerate the onset of *Hoxa9*-induced leukemia, and that in the absence of PKNOX1 CTD this function can be provided for by the transactivating domain of VP-16. We also show that the transforming ability conferred to PKNOX1 by MEIS1 CTD correlates with a distinct gene expression profile associated with wild type *Meis1*, but not *Pknox1* over-expression.

2.5 Material and methods

Animals

(C57Bl/6J-Ly5.2 x C3H/HeJ) F1-recipient and (C57Bl/6-Ly5.1 x C3H/HeJ) F1 congenic donor mice were bred in a specific pathogen-free (SPF) animal facility. Animal handling followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the experimental procedures were approved by the University of Montreal Deontology Committee on Animal Experimentation (CDEA).

Retroviral vectors

The retroviral and expression vectors MSCV-*Hoxa9*-PGK-NEO (#412),¹⁷ MSCV-pKOF-PGK-GFP (#1932),³⁰ MSCV-PGK-GFP (#652)¹⁸ and pCS2-*Pbx1a*-HA (#1452)²⁴ have been described. The MSCV-*Meis1a*-PGK-GFP (#1031) carries full length *Meis1a* cDNA, and the MSCV-FLAG-*Meis1a*-PGK-GFP (#1514) encodes N-terminal FLAG (DYKDDDDK) tagged MEIS1A. The cDNAs coding *Pknox1-SW*, *Pknox-MC* and *Pknox-VP16* mutants were generated by Overlap Extension polymerase chain reaction (PCR) using *Pknox1* (NM_016670) or *Meis1a* (NM_001193271) cDNA as templates, and the following primers: i) *Pknox1-SW* (#2102): *Pknox1* (forward 5' agttatcgaagatctaccatgatggcgacacagacg 3', and reverse 5' ctcggttgactggcttattggctggagaattcgtc 3') and *Meis1* (forward 5' gacgaattctccagccaatagaccagtccaaccgag 3', and reverse 5' aggtattgaagatctttacatgtagtccactgccc 3'); ii) *Pknox1-MC* (#2100): *Pknox1* (forward as for *Pknox1-SW*, and reverse 5' gttggactggctctatctctgaagggagtcgct 3'), and *Meis1* (forward 5' cagcgactcccttcagatgatagaccagtccaacc 3', and reverse as for *Pknox1-SW*); iii), *Pknox1-VP16* (#2106): *Pknox1* (forward as for *Pknox1-SW*, and reverse 5' acatcggtcgggggggctggctggagaattcgtc 3'), and VP16¹³ (forward 5' gacgaattctccagccagcccccccgaccgatgt 3' and reverse 5' agttatcgaagatctctagaattccccaccgtactcgtcaa 3'). The final PCR product was amplified using the forward *Pknox1* primer, and the reverse *Meis1* or VP16 primers. The *Pknox1-ΔC* (#2104) was generated by PCR amplification of *Pknox1* cDNA as a template using forward primer as for *Pknox1-SW*, and reverse 5' agttatcgaagatctctatggctggagaattcgtc 3'. The products of amplification reactions were sequenced, and the engineered cDNAs were subcloned in MSCV-PGK-GFP vector. Retroviral vectors coding for N-terminal FLAG-tagged mutants were generated by subcloning the cDNAs in the pKOF vector.³⁰ Details of vector construction are available upon request.

Bone marrow cell culture, retroviral infection and transplantation

Generation of recombinant ecotropic retrovirus-producing GP+E86 cells, primary bone marrow infections, transplantations and evaluation of gene transfer efficiency in each experiment were performed as described.^{17,31}

DNA and RNA analyses

Southern and northern blot analyses were performed as described.¹⁷ The GFP probe was a 730 bp *Gfp* fragment, and the *Pknox1* probe comprises the 5' 610 bp of the wild type *Pknox1* cDNA.

Co-immunoprecipitation and western blotting

Preparation of cytoplasmic and nuclear protein extracts,³² immunoprecipitations and western blotting were performed as described.²⁴ Primary antibodies used were anti-FLAG (Sigma-Aldrich), anti-Hemagglutinin (HA) (Abcam), α Tubulin (Cell Signaling Technology), histone H2A (Abcam) and isotype control antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Secondary anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies were from Santa Cruz Biotech.

Morphological characterization of leukemias and flow cytometry

Morphological features²⁴ and flow cytometric analyses of leukemic cell populations¹⁸ were performed as described. For the phenotypical evaluation of leukemias the following antibodies were used: APC-conjugated CD11b (BD Pharmingen), TER119 (BioLegend), and CD45R[B220] (Beckman Coulter); PE-conjugated CD11b and CD45R[B220] (BD Pharmingen); Biotin-conjugated CD3, IgM and TER119 (BD Pharmingen); PE-CY7 conjugated CD117[c-Kit] (eBioscience); Streptavidin-conjugated PE-CY7(eBioscience) and APC (BD Pharmingen); PE-CY5-conjugated Ly6A/E [Sca-1](eBioscience). Data were acquired using BDTM LSRII cytometer and FACSDiva 4.1 software (BD Pharmingen). Analyses were performed using the FlowJo software (TreeStar Inc, Ashland, OR).

Gene expression arrays

Primary BM cells isolated from 5-FU treated mice were infected with MSCV-*Hoxa9*-pgk-Neo^r. After 12 days, cells were distributed among co-cultures of *Flag-Meis1*, or *Flag-Pknox1*, or *Flag-Pknox1-MC* retrovirus-producing cells. After 2-day incubation, the non-adherent cell populations were harvested and RNA was extracted using Trizol reagent according to the manu-

facturer's protocol (Invitrogen). RNA was reverse-transcribed and labelled as previously described.³³ A total of 6 µg of Cy5-labelled cDNA were hybridized in biological duplicate to a Mouse Gene Expression 385K Array (A4543-00-01; Roche/NimbleGen) as recommended by the manufacturer. The microarrays were scanned using a GenePix 4000B scanner (Molecular Devices), and the data were extracted and normalized (RMA) using NimbleScan 2.5 software (Roche/NimbleGen), and expression data were analyzed using GeneSpring.GX v7.3 software (Agilent Technologies). Genes were included in the analysis if their probes signal intensities were above the values determined for random GC controls, and the threshold for differential expression of genes between datasets was a 2-fold difference.

D.A.V.I.D. functional annotation clustering

The gene lists obtained by comparing the test cell population to the parental *Hoxa9* cell population were investigated for enriched GO term-based biological processes using the D.A.V.I.D. Bioinformatics Resources 6.7 internet application (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).^{34,35} The significance of the ascertained biological processes was calculated using the "Ease score", a modified one-tail Fisher Exact Probability Value, which was further corrected for False Discovery Rate using the Benjamini correction.

Unique dataset determination

Datasets of genes uniquely modulated (up and down) in *Meis1*-expressing cells were retrieved by identifying genes whose expression levels were commonly up- (or down)-regulated compared to both the parental *Hoxa9* and the *Pknox1+Hoxa9* cell populations. The same analysis, but comparing to the parental *Hoxa9* and the *Meis1+Hoxa9* cells, was performed to ascertain genes uniquely modulated in the *Pknox1*-cell population. Both *Meis1* and *Pknox1* exclusive datasets were then analyzed for similarity with the *Pknox1-MC* dataset, as obtained by comparison with the parental *Hoxa9*-cells.

2.6 Results

C-terminal domain of MEIS1 converts PKNOX1 to a HOXA9-collaborating oncoprotein

The C-terminal domain (CTD) of MEIS1 is necessary for its transcriptional activity^{23,36,37} and required for acceleration of the *Hox*-induced leukemia.^{24,25} To examine whether MEIS1 CTD is sufficient to confer these two functions to the highly related, but non-transforming PKNOX1 we created a series of four PKNOX1 mutants (Fig. 2.1A) introducing the following modifications: i) deletion of the PKNOX1 CTD (PKNOX1- Δ C); ii) replacement of PKNOX1 CTD by the MEIS1 CTD (PKNOX1-SW); iii) addition of the MEIS1A CTD to the wild type PKNOX1 (PKNOX1-MC); and iv) replacement of PKNOX1 CTD by the VP16-derived transactivation domain (PKNOX1-VP16). The wild type and mutated cDNAs produced proteins of the predicted molecular weights as determined by western blot analyses (Fig. 2.1B). Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that these PKNOX1 mutants carrying modifications introduced into the C-terminal region of the protein retained their ability to interact with PBX1 (Fig. 2.1C and 2.1D), and no impairment of its nuclear import could be detected by confocal microscopy (Supplementary Fig. 2.1).

The ability of wild type and chimeric *Pknox1* gene products to accelerate *Hoxa9*-induced leukemia was evaluated in bone marrow transplantation assays. In agreement with our previously published observations,^{17,18,24} recipients of *Hoxa9* + *Meis1*-transduced cells succumbed to leukemia within 53 \pm 5 days compared to 166 \pm 14 days determined for *Hoxa9* chimeras, while the latency of AML development in mice transplanted with *Hoxa9* + *Pknox1*-transduced cells (172 \pm 8 days, P>0.2) was similar to that determined for the *Hoxa9* group (Fig 2.2A, 2.2B).

None of the PKNOX1 mutants was capable of inducing leukemia in the absence of *Hoxa9* co-overexpression, and recipients remained healthy during an extended period of observation (> 8 months, Fig. 2.2A). We first evaluated the pro-tumorigenic ability of PKNOX1 lacking its CTD (PKNOX1- Δ C), and the mutant in which the PKNOX1 CTD was replaced with MEIS1 CTD (PKNOX1-SW), and found that these two PKNOX1 mutants were not capable of collaborating with *Hoxa9* in AML development (Fig. 2.2A, B). In all groups of recipients, the transplantation inocula comprised similar proportions of doubly-transduced cells as determined by evaluating the proportions of GFP⁺[*Pknox1*] plus Neo⁺[*Hoxa9*] progenitor cell subpopulations (Supplementary Table 2.1), and GFP⁺ cells represented, on average, >50% of leukemic cell populations (Table 2.1). Moreover, Southern blot analyses of genomic DNA isolated from leukemic cells demonstrated the presence of the integrated wild type *Pknox1*, or *Pknox1*- Δ C,

or *Pknox1-SW* proviruses (Fig. 2.3A) which were transcribed (Fig. 2.3B) and translated (Fig. 2.3C) in the products of the predicted sizes. The failure of PKNOX1- Δ C or PKNOX1-SW to accelerate development of *Hoxa9*-induced leukemia therefore could not be attributed to a poor gene transfer or silencing of the integrated proviruses. These observations rather suggested that the PKNOX1 CTD is not involved in prevention of *Pknox1* and *Hoxa9* collaboration in AML development, and that MEIS1 CTD positioned adjacent to the PKNOX1 HD was not capable of conferring the transforming function to the PKNOX1-SW chimera. Identical position of the VP16-transactivating domain in the PKNOX1-VP16 fusion created, however, a HOXA9-collaborating oncoprotein, and recipients of *Hoxa9 + Pknox1-VP16*-transduced cells rapidly succumbed to AML (62 ± 3 days; Fig. 2.2A, 2.2B), suggesting an absence of intrinsic determinants preventing conversion of PKNOX1 into a leukemia-promoting HOXA9 partner.

To further explore this possibility we next examined the leukemogenic properties of PKNOX1 chimera carrying the MEIS1 CTD fused to the C-terminal amino acid (Q436) of PKNOX1 (PKNOX1-MC). In contrast to PKNOX1-SW, PKNOX1-MC noticeably accelerated the onset of *Hoxa9*-induced leukemia, and all recipients of doubly-transduced cells died of AML after latency comparable to that determined for *Hoxa9 + Meis1* mice (Fig. 2.2A, 2.2B). Southern blot analysis of proviral integrations in DNA extracted from BM also revealed that in all experimental groups the leukemias arose from multiple independent integration events (Fig. 2.3A) whereas northern and western blot analyses confirmed that the proviruses were transcribed (Fig. 2.3B) and translated (Fig. 2.3C). Together, these observations suggested that MEIS1 CTD is sufficient to confer to PKNOX1 the ability to accelerate the *Hoxa9*-induced leukemia.

PKNOX1-MC accelerates the development, but has no impact on the phenotype of HOXA9-induced leukemia

Supporting our previously reported observations,^{17,18,24} all recipients of *Hoxa9 + Meis1*- and *Hoxa9 + Pknox1*-transduced cells succumbed to AML. The PKNOX mutants evaluated in this study had no noticeable effect on the phenotype of the *Hoxa9*-induced disease. All sick mice had elevated white blood cell (WBC) counts (Table 2.1), and high proportions of immature/blastic myeloid cells in the peripheral blood and bone marrow (Fig. 2.4; Table 2.1). Analyses of bone marrow cell surface markers showed that in all experimental groups, the leukemic cell populations expressed high levels of myeloid marker CD11b, varying levels of CD117 (Table 2.1) and were negative for stem cell antigen Ly-6A/E, erythroid TER119, and lymphoid markers CD45R

and CD3, suggesting that majority of leukemias comprised immature myeloid cells (data not shown).

MEIS1 and PKNOX1-MC regulate an overlapping subset of target genes

Results of our *in vivo* studies suggested that MEIS1 CTD is sufficient to convert the PKNOX1 into a HOXA9-collaborating oncoprotein. Given the overlap between the transactivating and transforming functions attributed to MEIS1 CTD^{23,24,36,38} we postulated that MEIS1 and PKNOX1-MC chimera also regulate an overlapping subset of target genes required for acceleration of *Hoxa9*-induced leukemia. To assess this possibility we analyzed the global gene expression profiles of primary bone marrow cell populations engineered to co-overexpress *Hoxa9* plus *Meis1*, or *Pknox1*, or *Pknox1-MC*. Briefly, the *Hoxa9*-transduced cell populations recovered from 2-day co-culture with producers of *Meis1-Gfp*, or *Pknox1-Gfp*, or *Pknox1-MC-Gfp* recombinant retroviruses were immediately divided between requirements for flow cytometry, transplantation, and RNA extraction. The recovered cell populations comprised similar proportions of GFP⁺ cells (45-50%, data not shown), expressed the corresponding protein products (fig. 2.5A, right panel) and led to AML development within the previously established time frame (Fig. 2.5A, left panel).

To determine the molecular profile of these doubly-transduced cells we first identified sets of genes whose expression levels were up-regulated at least 2-fold compared to the parental *Hoxa9* population, and found 1202 genes up-regulated in response to *Meis1*, 885 in response to *Pknox1*, and 787 in response to *Pknox1-MC* (Fig. 2.5B). To identify potential enrichments for clusters of functionally related annotations associated with various biological processes these datasets were then analyzed using the DAVID (The database for annotation, visualization and integrated discovery) Bioinformatics Resources.^{34,35} No significant enrichment ($P \leq 0.05$) for distinct gene ontology (GO) terms could be determined in response to *Pknox1* (Fig. 2.5C, group II). The *Meis1* dataset comprised annotation clusters highly enriched in GO terms for genes associated with processes such as DNA packaging, chromosomal organization, cell cycle, cell division and protein phosphorylation (Fig. 2.5C, group I), and the same functional gene subsets were activated in response to *Pknox1-MC* (Fig. 2.5C, group III). This expression pattern also characterized the subset of genes shared between the *Pknox1-MC* and *Meis1* (Fig. 2.6A, 2.6B: group IV), was not detectable among the unique *Pknox1-MC* up-regulated genes (fig. 2.6A, 2.6B: Group VI), but was partially recapitulated in the *Meis1* dataset (Fig. 2.6A, 2.6B: group

V). The same analytical approach was then applied to identify and classify subsets of genes down-regulated in response to over-expression of *Meis1*, or *Pknox1-MC*, or *Pknox1*. In each experimental group, expression levels of over 1,000 genes were reduced compared to the parental *Hoxa9* cells, but no enrichments for transcripts denoting suppression of distinct biological processes could be detected in the unique or the *Meis1/Pknox1-MC*-shared gene subsets (data not shown).

The functional annotation clustering suggested a correlation between the enrichments in GO terms associated with cell proliferation and the ability of MEIS1 and PKNOX1-MC to accelerate the *Hoxa9*-induced leukemia. Examination of the highest scoring annotations also revealed that MEIS1 and PKNOX1-MC shared the ability to activate sets of genes with similar functions, though not necessarily the same genes. The unique *Meis1+Hoxa9* dataset, as determined by an additional comparison between wild-type *Meis1* and *Pknox1* datasets (Supplementary Table 2.2 and Supplementary Fig. 2.2, top panel, A), for example, comprised the previously identified *Meis1* targets *Nrip1*, *Mylk*, *Tet1*, *Meis1* and *Neto2*.^{23,25,38} Intersection between the unique *Meis1+Hoxa9* and *Pknox1-MC* datasets (Supplementary Table 2.2 and Supplementary Fig. 2.2, top panel, D) comprised 23 shared genes, including *Meis1*, *Mylk* and *Neto2*, but not *Nrip1* or *Tet1*. This observation suggested that ectopic MEIS1 CTD retained most, but not all functions required for MEIS1 activity, and was consistent with slightly longer AML latency observed in *Hoxa9+Pknox1-MC* recipients compared to *Hoxa9+Meis1* group (80±6 and 53±5 days, respectively; *P* value = 0.024 as determined by unpaired two-tailed Student T-test, Fig. 2.2B). Additional interesting findings were strong up-regulation of *Vhr* (*Dusp3*) in the *Meis1* dataset, but down-regulation of this gene and of the previously identified MEIS1 target *Flt3* in the *Pknox1* group (Supplementary Table 2.2-2.3) and Supplementary Fig. 2.2, bottom panel, F), suggesting that MEIS1 and PKNOX1 may play opposing roles in regulation of some target genes.

2.7 Discussion

The C-terminal domain of MEIS1 is essential for its transactivating and pro-tumorigenic functions.^{23-25,36} In this report we demonstrate that MEIS1 CTD is sufficient to convert the non-transforming PKNOX1 into a HOXA9-collaborating oncoprotein. Results of our experiments show that the wild type MEIS1 and the chimeric PKNOX1 comprising the MEIS1 CTD regulate an overlapping functional gene subsets, and suggest that leukemogenic potential of MEIS1 reflects its ability to deregulate multiple pathways implicated in control of cellular proliferation and division.

Results presented in this report identify MEIS1 CTD as a functional module capable of activating oncogenic pathways even when presented in a heterologous PKNOX1 context. Fusion of MEIS1 CTD immediately adjacent to the PKNOX1 HD (PKNOX1-SW) abolished this transforming function, indicating that the proximity of heterologous HD interfered with the activity of Meis1 CTD. Supporting this possibility, deletion of the HD enhanced affinity of PKNOX1 for PBX-HOX heterodimers and enhanced the transactivation potential of the resulting complex,³⁹ while Huang et al.³⁶ proposed that on some enhancers the HD could affect the ability of MEIS1 to present its CTD in a conformation required for recruitment of transcriptional co-activators. It is conceivable that in the pro-tumorigenic PKNOX1-MC chimera, the spacer (i.e., the PKNOX1 CTD) that separates the PKNOX1 HD and Meis1 CTD was sufficient to relieve the HD-imposed constraints that prevented unmasking the activation domain of MEIS1 CTD in the context of PKNOX1-SW.

The MEIS1 CTD, in either the context of PKNOX1-MC chimera or the wild type MEIS1, activated the same functional gene families and exhibited comparable, albeit not entirely equivalent transformation properties which could reflect incomplete presentation of CTD, or the requirement for cooperative action of several MEIS1 domains. Favouring the latter possibility, several studies have demonstrated that the N-terminal region and the HD^{23-25,40} contribute to, but are not essential for the pro-leukemogenic function of MEIS1. These studies also highlighted a possibility that the DNA binding-dependent and independent activities of MEIS1 could have complementary roles in acceleration of *Hoxa9*-induced AML.

To date, several hundred genes have been identified as potential MEIS1 targets.^{23,25,38,41} However, there is only a minor overlap in differentially expressed genes identified in these transcription profiling studies, indicating that MEIS1 might activate multiple different genes in a genetic and cell context-dependent manner. Our transcriptome analyses thus focused on iden-

tification of biological processes, as defined by activities of functionally related gene families, rather than on the identity of individual genes perturbed in response to high levels of MEIS1 or PKNOX1. Results of these analyses suggest that the pro-tumorigenic activity of MEIS1 correlates with enhanced activity of numerous genes implicated in regulation of cellular proliferation and maintenance of genome integrity. These observations thus extend the growing body of evidence identifying MEIS1 as a positive regulator of leukemic cell proliferation,^{21,42,43} and support the model predicting that pro-tumorigenic activity of MEIS1 reflects its ability to deregulate multiple complementary biological pathways.

Longobardi et al.²² reported that homozygosity for hypomorphic *Pknox1*^{hi} allele generates a tumor-prone phenotype, and that *Pknox1* haploinsufficiency accelerates lymphoma development in EμMyc mouse model, suggesting a tumor suppressor role for PKNOX1. These observations and our results showing that *Pknox1* and *Hoxa9* do not collaborate in AML development (this study, and Thorsteinsdottir et al.¹⁸) are not mutually exclusive, but rather imply that the cellular context might restrict the suppressor function of PKNOX1. Consistent with this possibility, we observed no *Pknox1*-specific enrichment in GO terms associated with regulation of cellular proliferation and/or survival in our *Hoxa9+Pknx1* bone marrow model.

We show that activation of oncogenic pathways comprising the *Meis1* target genes can be attributed to the transactivating function exhibited by the MEIS1 CTD. PKNOX1 was reported to cooperate with the HOX/PBX complex in the *in vitro* transactivation assays,³⁹ and to physically associate with and regulate activity of *Bcl2l1* (*Bcl-x*) and *Tp53* (*p53*) *in vivo*.⁴⁴ PKNOX1, however, has no identifiable transactivation domain and shares the target sequences with MEIS,³⁹ suggesting that PKNOX1/PBX and MEIS1/PBX complexes could be interchangeable at some regulatory sequences. PKNOX1 could thus suppress the oncogenic pathways by preventing the MEIS1-dependent recruitment of transcriptional co-activators and/or co-repressors to the target loci. Supporting this possibility we show that addition of MEIS1 CTD to full length PKNOX1 is sufficient for activation of *Meis1*-associated oncogenic pathways, and that MEIS1 and PKNOX1 differentially regulate the expression of a subset of genes involved in cellular proliferation such as *Vhr* (*Dusp3*).⁴⁵

Together, results presented in this report show that elevated levels of MEIS1 perturb expression of numerous genes implicated in several oncogenic pathways, and suggest a direct role for PKNOX1 in attenuation of the pro-tumorigenic activity of MEIS1.

2.8 Tableau

Tableau 2.1 Characteristics of AML from recipient mice

Table 2.1. Characteristics of AML resulting from genetic interactions between *Hoxa9* and wild type or mutant *Ptnox1*

Genotype	AML latency (days)	Spleen weight (mg)	WBC (cells x 10 ⁹ /L)	Blasts (% of total)		GFP ⁺ cells (% BMC)	CD11b ⁺ cells (% BMC)	CD117 ⁺ cells (% BMC)
				PBL	BM			
Control	N.A.	120 ± 13 (20)	6 ± 1 (5)	N.A.	18 ± 3 (1)	N.A.	48 (1)	6 (1)
<i>Hoxa9</i>	166 ± 14 (8)	394 ± 77 (4)	83 ± 41 (6)	45 ± 6 (6)	55 ± 6 (5)	N.A.	N.D.	N.D.
<i>Hoxa9</i> + <i>Meis1</i>	53 ± 5 (7)	288 ± 38 (5)	146 ± 83 (4)	64 ± 2 (4)	70 ± 7 (6)	63 ± 17 (3)	91 ± 2 (3)	40 ± 13 (3)
<i>Hoxa9</i> + <i>Ptnox1</i>	172 ± 8 (12)	528 ± 51 (9)	350 (1)	71 (1)	60 ± 7 (2)	50 ± 18 (7)	91 ± 5 (7)	17 ± 5 (7)
<i>Hoxa9</i> + <i>Ptnox1</i> -ΔC	155 ± 13 (12)	547 ± 25 (4)	193 ± 29 (3)	39 ± 10 (3)	60 ± 9 (4)	78 ± 19 (5)	91 ± 3 (5)	34 ± 9 (5)
<i>Hoxa9</i> + <i>Ptnox1</i> -SIW	141 ± 11 (18)	527 ± 53 (10)	478 ± 195 (6)	57 ± 6 (6)	65 ± 5 (6)	87 ± 5 (6)	93 ± 2 (6)	16 ± 5 (6)
<i>Hoxa9</i> + <i>Ptnox1</i> -I/P16	53 ± 5 (15)	291 ± 21 (15)	89 ± 30 (13)	56 ± 4 (13)	80 ± 5 (11)	94 ± 2 (5)	88 ± 2 (5)	40 ± 4 (4)
<i>Hoxa9</i> + <i>Ptnox1</i> -MC	80 ± 6 (16)	379 ± 33 (14)	182 ± 51 (13)	56 ± 4 (13)	70 ± 5 (5)	74 ± 14 (6)	90 ± 3 (6)	22 ± 8 (6)

Numbers in brackets represent numbers of mice analyzed in each category

2.9 Figures

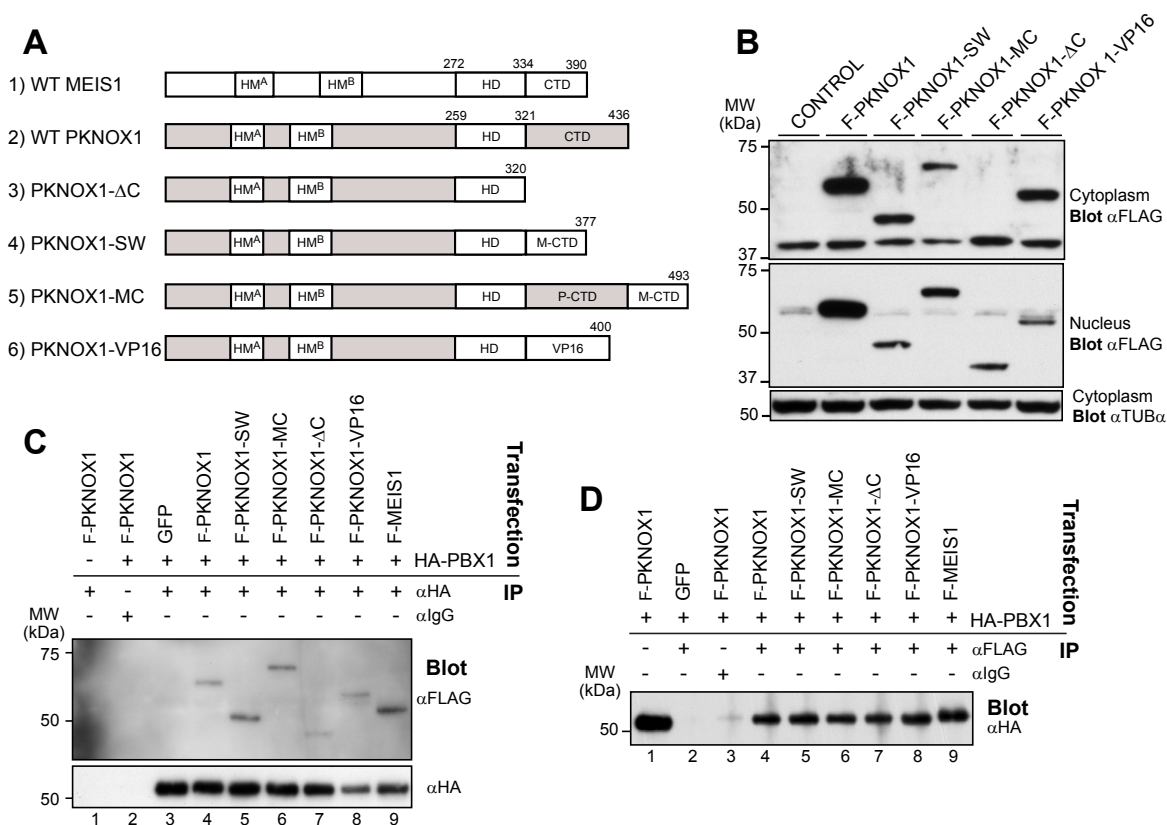


Figure 2.1 Structural and biochemical properties of wild type and mutant PKNOX1 proteins.

(A) Schematic representation of the mutants used in this study. Numbers above the constructs indicate amino acid positions. HM^A/HM^B: Homothorax-Meis domain A/B; HD: homeodomain; M-CTD: MEIS1 C-terminal domain; P-CTD: PKNOX1 C-terminal domain. (B) Western blot analysis of FLAG-tagged wild type and mutant PKNOX1 expression in cytoplasmic (top) and nuclear (middle) lysates of GP-E+86 producer cells infected with retroviruses expressing the indicated constructs. Tub α levels are shown as a loading control (bottom panel). (C) Immunoprecipitation of lysates from NIH-3T3 cells transfected with the constructs indicated above the horizontal line was carried using anti-HA or an isotypic antibody, as shown above the top panel. The amount of interacting FLAG-tagged mutants was determined by western blot analysis using anti-FLAG antibody (top panel) whereas the amount of precipitated HA-tagged PBX1A was determined by anti-HA antibody (bottom panel). (D) Immunoprecipitation of lysates from NIH-3T3 cells transfected with the constructs indicated above the horizontal line was performed using anti-FLAG or isotypic antibody, as shown. The amount of interacting HA-tagged PBX1A was deter-

mined using anti-HA antibody. Input level is shown in lane 1 and corresponds to 30 μ g of protein.

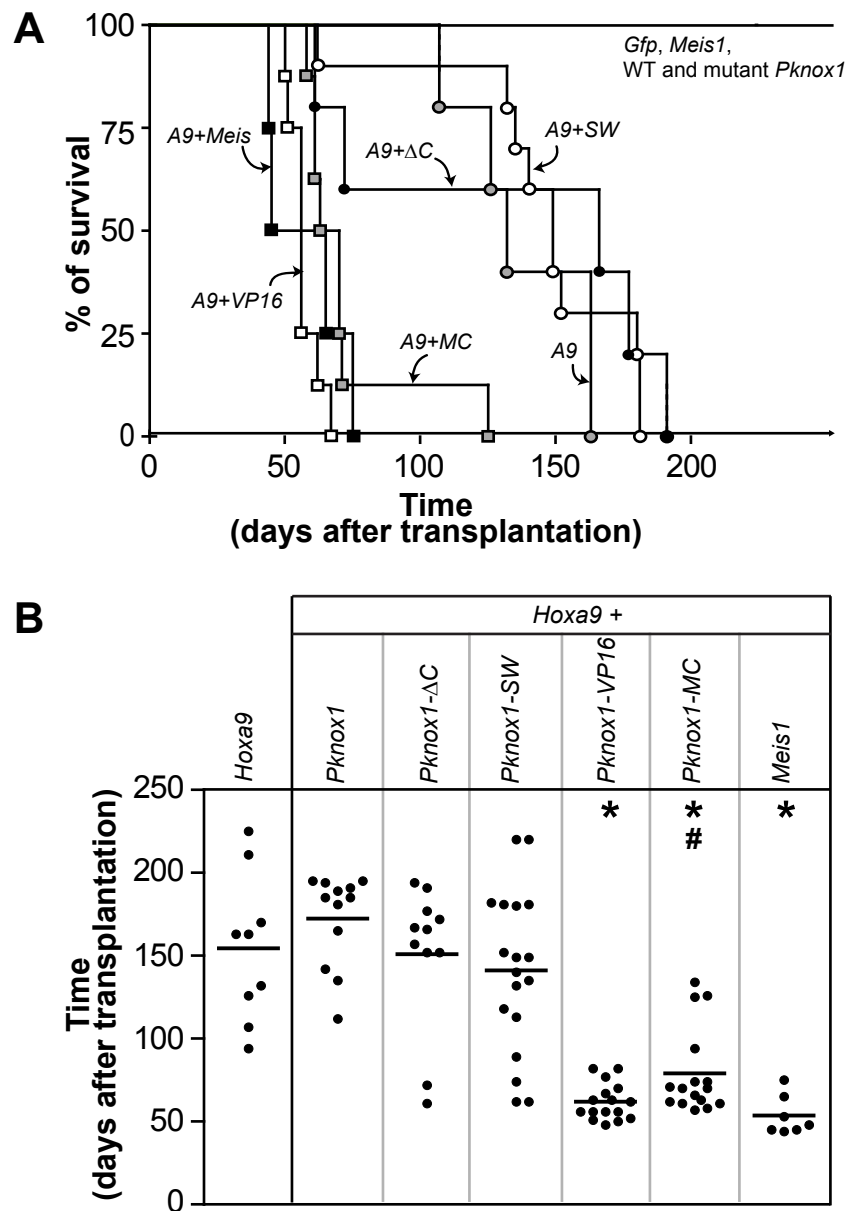


Figure 2.2 Identification of the *Pknox1*-mutants capable of accelerating *Hoxa9*-induced leukemia development.

(A) Survival curve of mice that received a transplant of bone marrow cells transduced with *Hoxa9*, or *Hoxa9* plus *Pknox1*-mutants, or *Hoxa9* plus wild type *Meis1* or *Pknox1*, or control (*Gfp*) and various TALE cDNAs alone. (B) AML latency in groups of mice identified on the top. * indicates p-value < 0.0001, as determined by unpaired two-tailed Student T-test, when compared to mice that received *Hoxa9*-transduced cells. # indicates p-value = 0.024, as determined by unpaired two-tailed Student T-test, when comparing mice that received *Hoxa9*+*Meis1* and *Hoxa9*+*Pknox1*-*MC*-transduced cells.

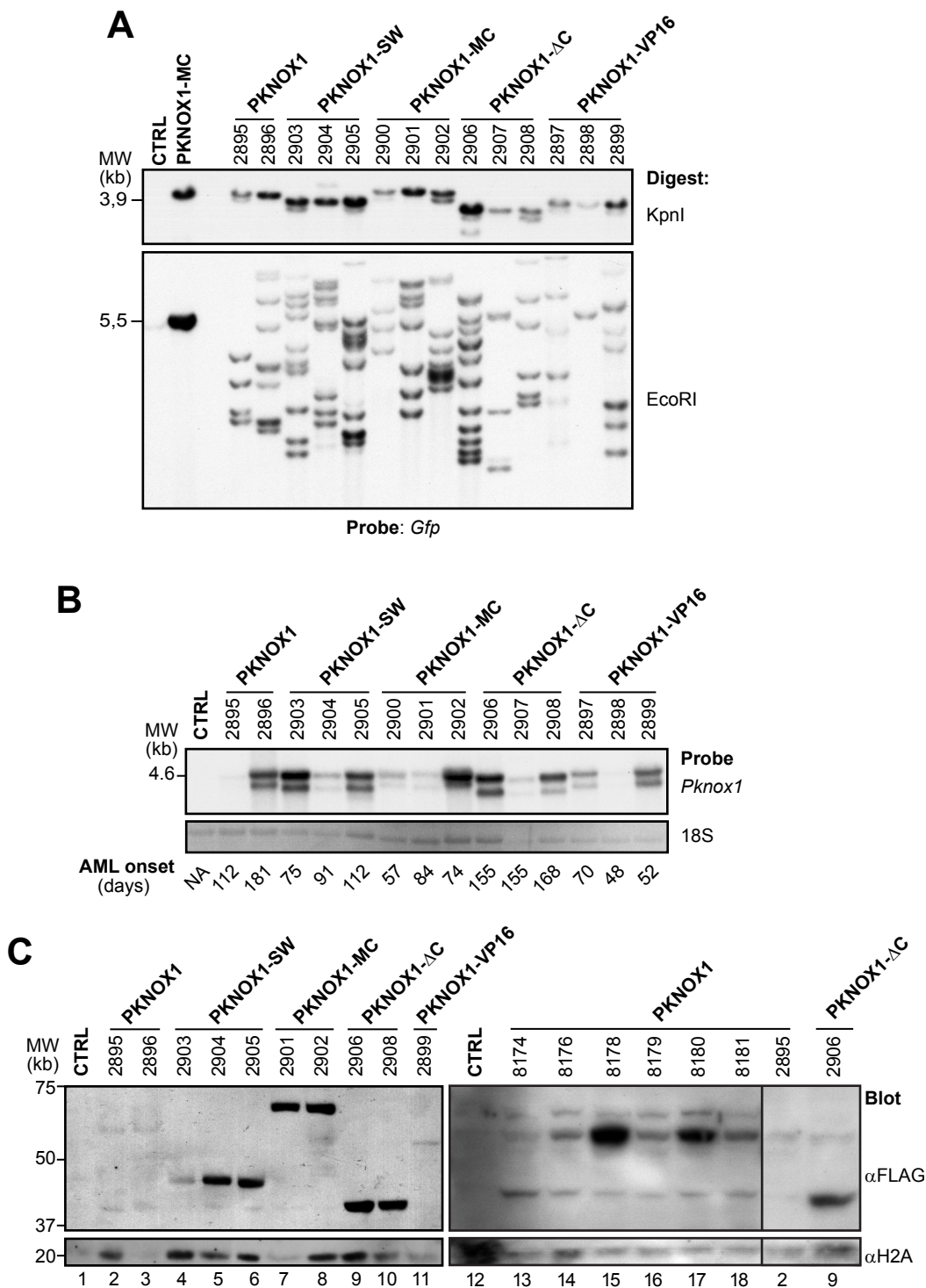


Figure 2.3 Leukemias comprise the wild type and mutant *Pknox1*-transduced cells.

(A) Southern blot analysis of proviral integrations in genomic DNA isolated from the bone marrow of leukemic mice. Top panel: DNA was digested with KpnI to release the integrated wild

type or mutant *Pknox1* (3,8 kb - 4,2 kb) proviruses detectable with a *gfp*-specific probe. Bottom panel: Clonal analyses of leukemic cell populations. DNA was digested with EcoRI, which cuts inside the provirus, and generates a unique DNA fragment for each integration event. Membrane was hybridized with a *gfp*-specific probe. The identity of the various *Pknox1* cDNAs co-transduced together with *Hoxa9* is indicated on top, and the numbers represent individual mice analyzed. Note that material obtained from this representative group of mice was used for all analyses shown in this figure. Control lane contains genomic DNA isolated from untransduced bone marrow cells. Digest of the *Pknox1-MC* retroviral vector is shown as a positive control. **(B)** Top panel: northern blot analysis of wild type and mutant *Pknox1* mRNA levels in total RNA isolated from bone marrow cells of leukemic mice. The membranes were hybridized with a 610 bp wild type *Pknox1* cDNA. The double *Pknox1* band originates from the presence of an alternative splice site in the retroviral vector.⁴⁶ Bottom panel: 18S RNA levels are shown as a loading control. Control lane contains RNA isolated from untransduced bone marrow cells. The average AML latency in days is indicated below. **(C)** Western blot analysis of PKNOX1 levels in nuclear extracts obtained from bone marrow cells of leukemic mice. Top panels: the membranes were hybridized with anti-FLAG to detect expression of the FLAG-tagged PKNOX1-mutants. Bottom panels: Histone 2A levels are shown as a loading control. Lanes #1-12 and #13-18 contain samples from two distinct experiments.

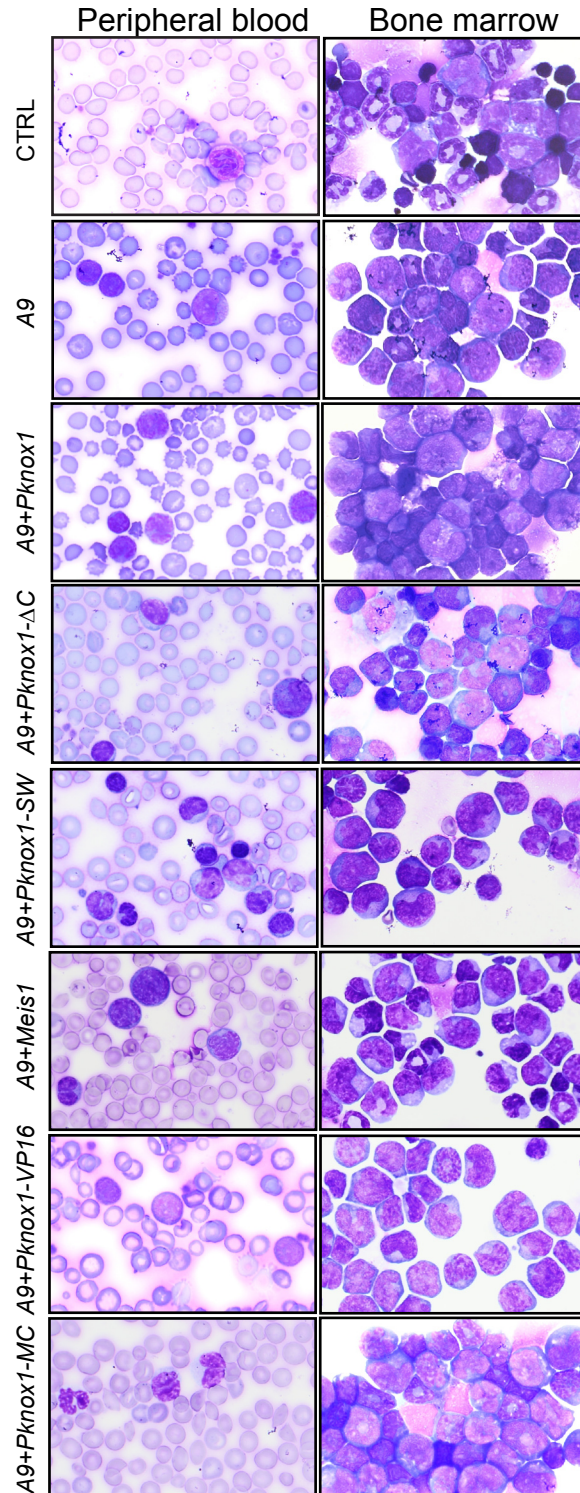


Figure 2.4 Morphological characterization of leukemias.

Representative samples of Wright-stained peripheral blood smears (right column) and bone marrow cytopsin (left column), 100 x magnification. Genotypes of leukemias are shown on the left.

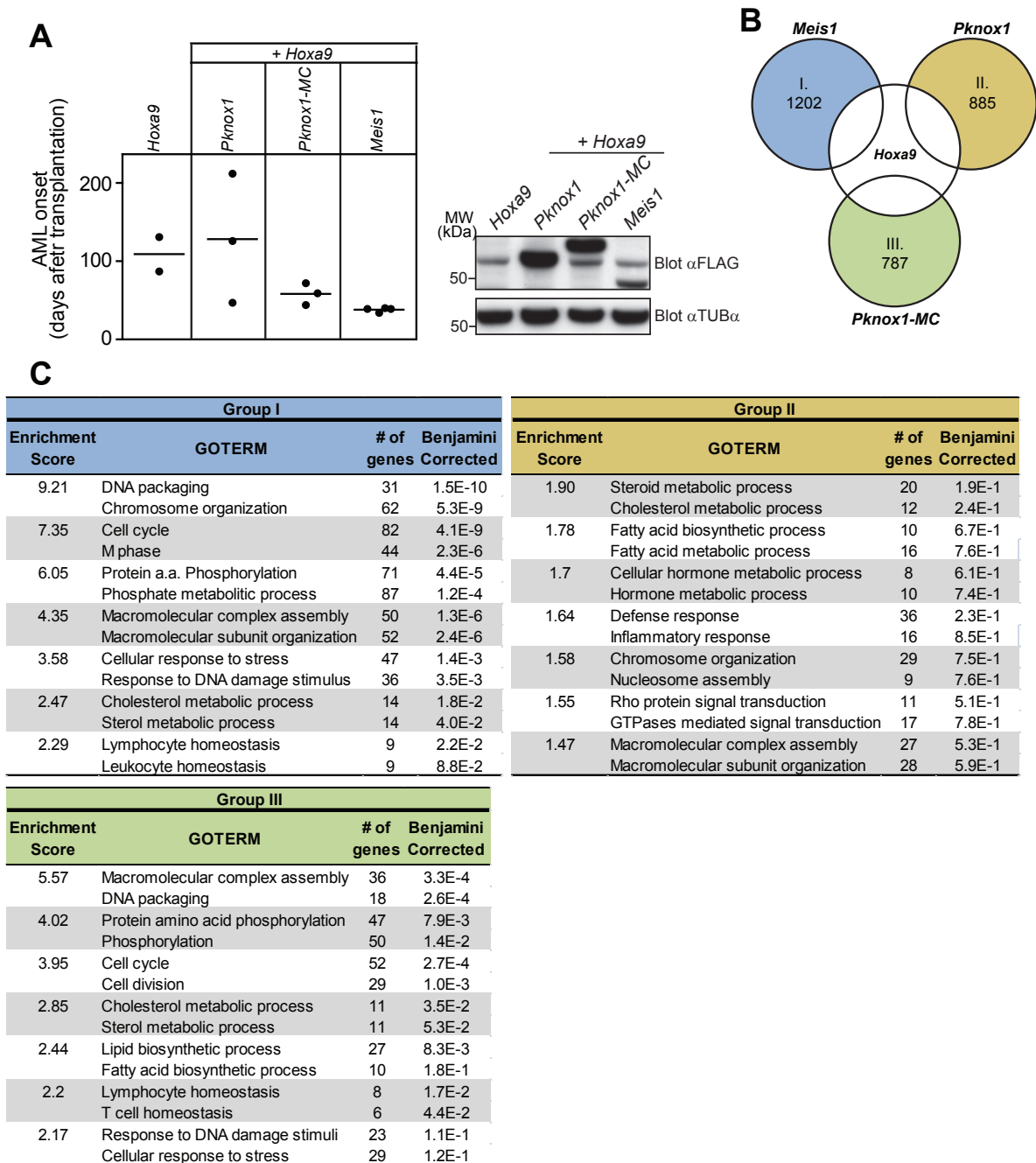


Figure 2.5 Impact of *Pknox1-MC*, *Meis1* and *Pknox1* expression on global gene expression profile of *Hoxa9*-transduced cells.

(A) Left panel: Survival plot of mice transplanted with 2×10^5 cells used for expression profiling. The genotypes of the transplanted cell populations are shown on top. Right panel: Western blot analysis of FLAG-tagged protein expression in lysates from recovered cells. Tubulin α levels are shown as a loading control. (B) Venn diagram depicting strategy for identification of genes

exhibiting in response to *Meis1* (group I), *Pknox1* (group II) and *Pknox1-MC* (group III) at least 2-fold increase in expression levels compared to the parental *Hoxa9* cell population. The number of genes found in each of these datasets is indicated inside the circle. **(C)** Identification of transcript clusters enriched in GO terms associated with distinct biological processes in the gene datasets determined as shown in **(B)** as determined by the D.A.V.I.D. bioinformatics software. Only the top two enriched GO terms are shown for each functional cluster. The Enrichment Score refers to the negative log transformation on the geometric mean of the p-values obtained for each of the clustered enriched term. The Benjamini corrected p-value provided for each biological process represents a one-tail Fisher Exact Probability Value further corrected for False Discovery Rate using the Benjamini correction.

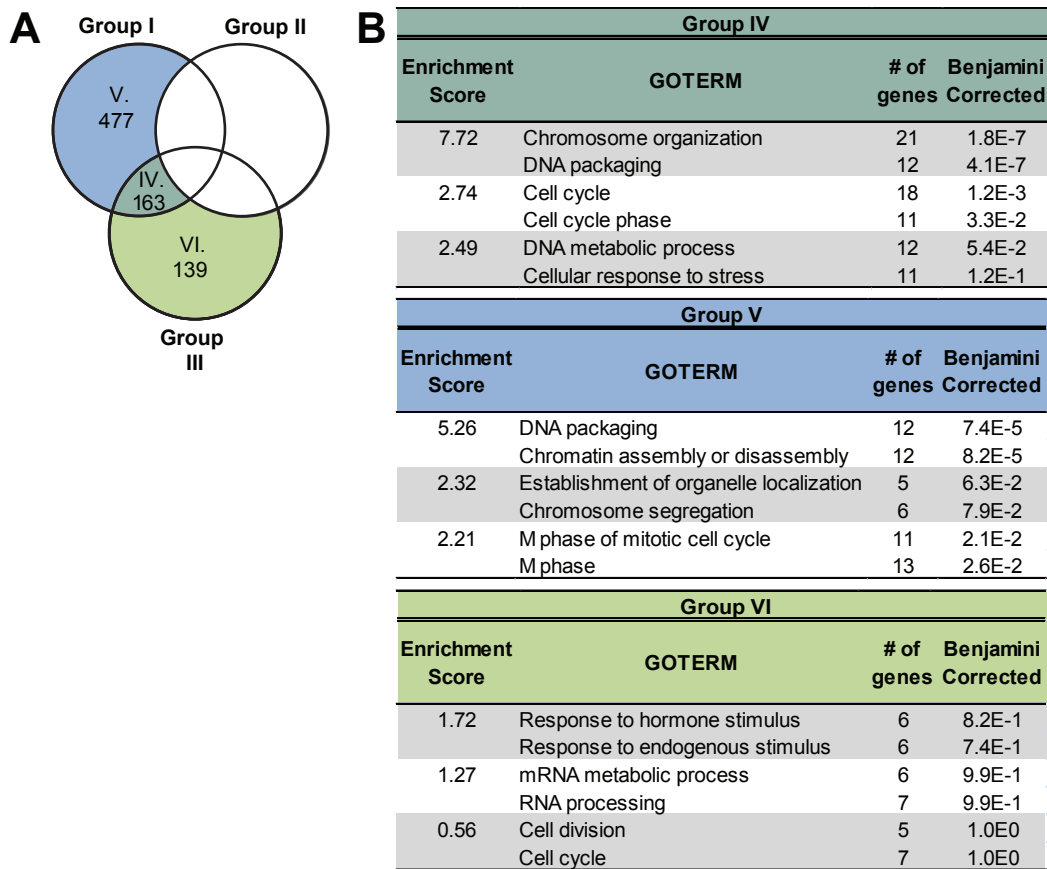


Figure 2.6 Comparison between datasets representing genes up-regulated in cells expressing *Hoxa9+Meis1* and *Hoxa9+Pknx1-MC*.

(A) The overlap between genes up-regulated in the *Meis1+Hoxa9* and *Pknx1-MC+Hoxa9*, but not in the *Pknx1+Hoxa9* cells compared to the parental *Hoxa9* cells is shown by Venn diagram.

(B) Enrichment for GO terms associated with various biological processes in the gene datasets defined as shown in A (group IV, V and VI) was performed as described for Figure 5C.

2.10 Supplementary material

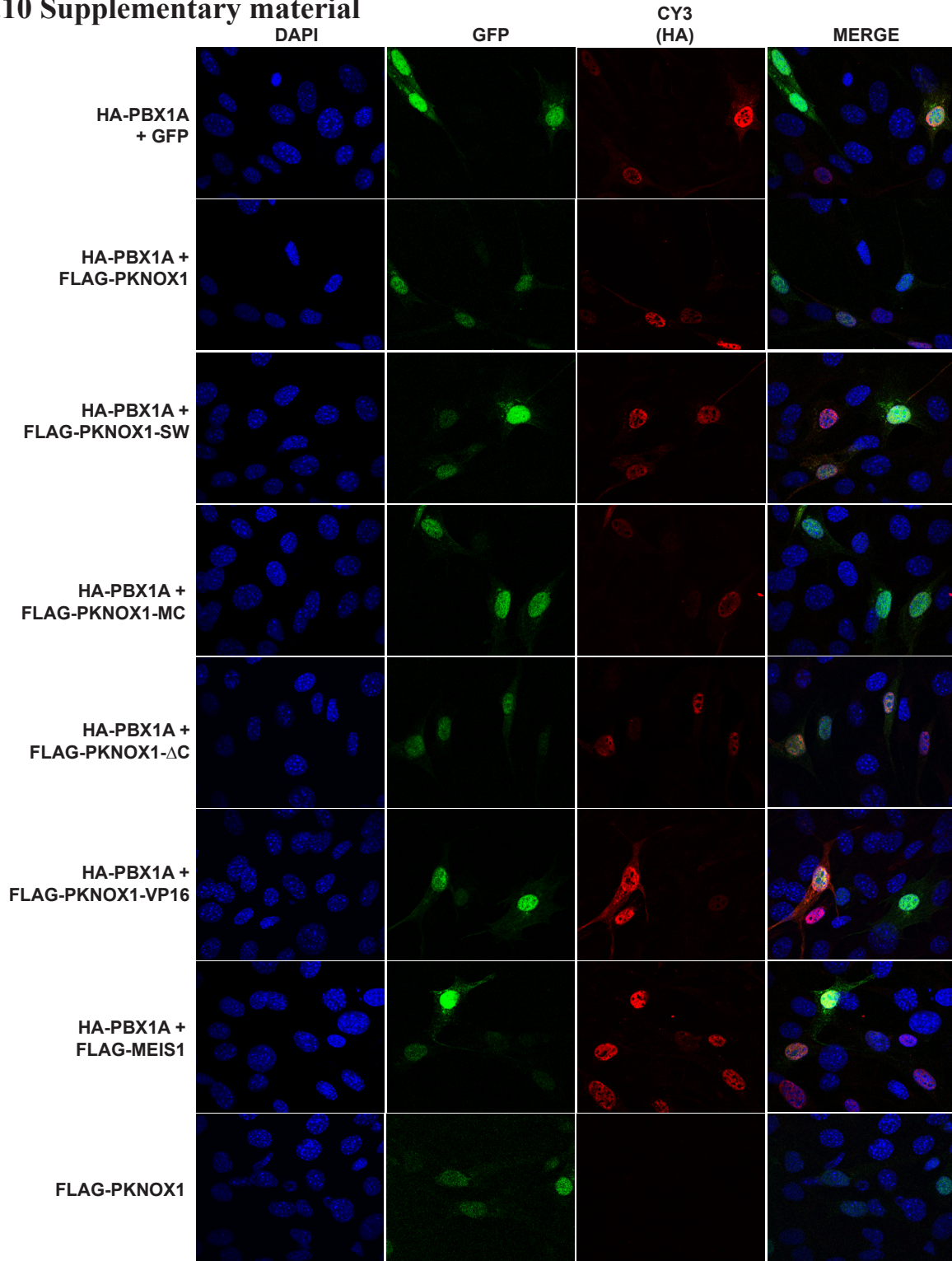


Figure S2.1 Subcellular localization of HA-tagged PBX1A co-expressed with FLAG-tagged *Pknox1*-mutants.

HA-PBX1A subcellular localization analysis was performed using immuno-fluorescence con-

focal microscopy on NIH-3T3 cells grown on coverslips and transiently transfected with constructs indicated on the left. Cells were fixed with 1% PFA, permeabilized with 1% BSA + 0,25% Triton and stained with DAPI (left panels) and anti-HA antibody. The HA antibody was recognized by Cy3-labelled anti-rabbit antibody (third column). GFP denotes the presence of the Green Fluorescent marker Protein encoded by the vectors containing *Pknox1*, the *Pknox1*-mutants or *Meis1* (second column).

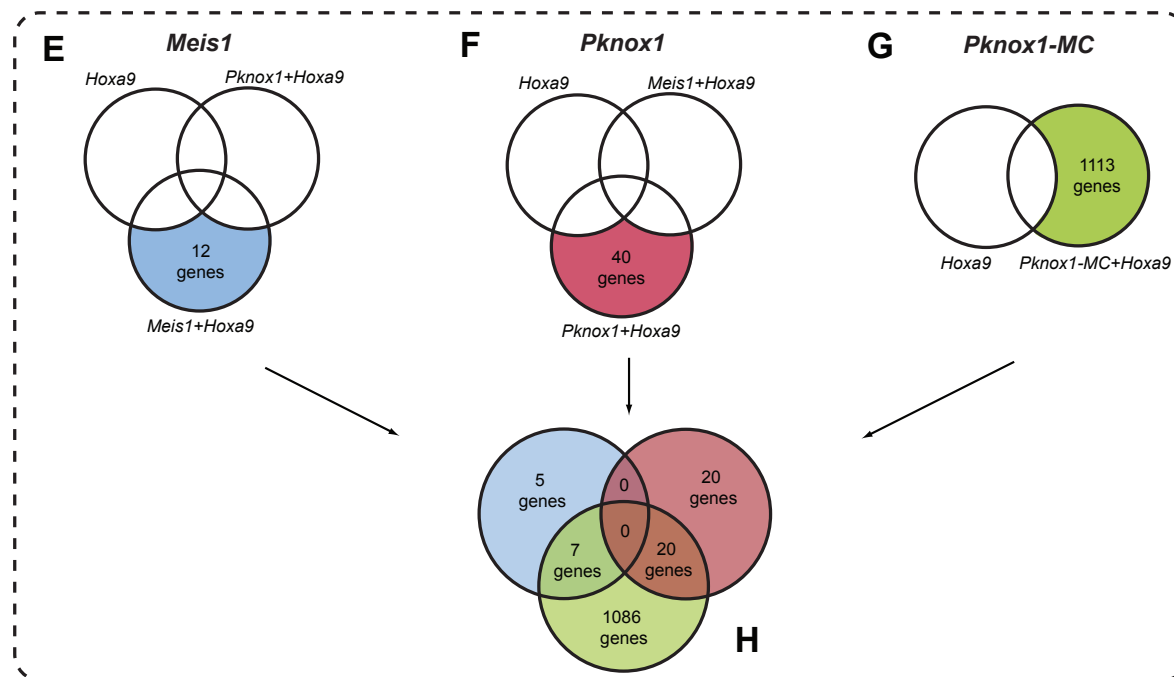
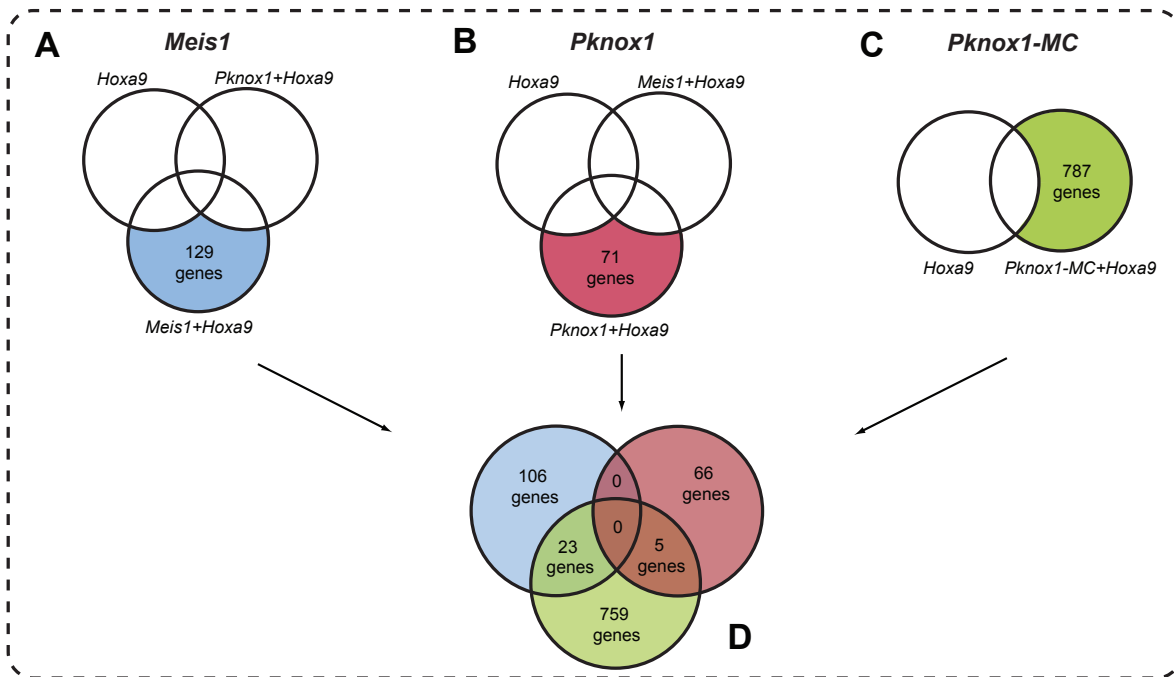


Figure S2.2 Identification of the unique MEIS1 or PKNOX1 associated perturbations in gene expression.

Top panel: up-regulated genes. (A) Determination of gene subsets unique for the *Meis1+Hoxa9*, but not the *Pknox1+Hoxa9* or the parental *Hoxa9* cells; (B) Determination of genes unique for the *Pknox1+Hoxa9*, but not the *Meis1+Hoxa9* or the parental *Hoxa9* cells; (C) De-

termination of genes unique for the *Pknox1-MC+Hoxa9*, but not for the parental *Hoxa9* cells; (D) Intersection of the *Pknox1-MC+Hoxa9* dataset identified in (C) with the unique *Meis1+Hoxa9* (A) and *Pknox1+Hoxa9* (B) gene subsets. Bottom panel: Down-regulated genes. Analyses were performed as described for the up-regulated genes in the top panel.

Tableau S2.1 Experimental details of the bone marrow reconstitution assay

Supplementary Table 2.1. Experimental details of the bone marrow reconstitution assay

Expt #	Virus	n	Gene transfer efficiency (%)*	Helper cells	GFP ⁺ cells at 4 weeks (%)
1	GFP	2	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Hoxa9</i>	3	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Meis1a</i>	3	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Pknox1-SW</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Pknox1-MC</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Pknox1-ΔC</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Pknox1-VP16</i>	4	N.D.	2x10 ⁵	N.D.
	<i>Hoxa9 + Meis1a</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	11
	<i>Hoxa9 + Pknox1-SW</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	6
	<i>Hoxa9 + Pknox1-MC</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	11
	<i>Hoxa9 + Pknox1-ΔC</i>	4	N.D.	2x10 ⁵	3
	<i>Hoxa9 + Pknox1-VP16</i>	5	N.D.	2x10 ⁵	9
	2	<i>Hoxa9</i>	5	35	w/o
<i>Pknox1-SW</i>		5	40	w/o	2
<i>Pknox1-MC</i>		4	76	w/o	3
<i>Pknox1-ΔC</i>		5	73	w/o	2
<i>Pknox1-VP16</i>		5	100	w/o	8
<i>Hoxa9 + Meis1a</i>		10	15	w/o	34
<i>Hoxa9 + Pknox1-SW</i>		9	27	w/o	4
<i>Hoxa9 + Pknox1-MC</i>		5	22	w/o	13
<i>Hoxa9 + Pknox1-ΔC</i>		9	23	w/o	2
<i>Hoxa9 + Pknox1-VP16</i>		4	49	w/o	47
3	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1</i>	2	100	w/o	7
	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1-SW</i>	3	40	w/o	7
	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1-MC</i>	3	60	w/o	4
	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1-ΔC</i>	3	75	w/o	8
	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1-VP16</i>	3	100	w/o	10
4	<i>Hoxa9</i>	5	100	w/o	0
	<i>Hoxa9 + ^{FLAG}-Pknox1</i>	10	59	w/o	11

* As determined by CFC assay on methyl-cellulose prior to transplantation

Tableau S2.2 Genes uniquely and commonly upregulated by TALE factors

Genes uniquely upregulated in Meis1+Hoxa9 cells				Upregulated in Pknox1-MC and Meis1				Genes upregulated in Pknox1				Genes in MC and Pknox1	
Entrez	Symbol	Entrez	Symbol	Entrez	Symbol	Entrez	Symbol	Entrez	Symbol	Entrez	Symbol	Entrez	Symbol
71903	2310038E17Rik	23871	Ets1	19301	Pxmp2	15446	Hpgd	11936	Fxd2	84506	Hamp	15129	Hbb-b1
15202	Hemt1	22256	Ung	20679	Sox6	17229	Tpsb2	12919	Crbp	93761	Smarca1	22169	Cmpk2
26414	Mapk10	26420	Mapk9	93675	Clec2i	17268	Meis1	13097	Cyp2c38	99899	Ifi44	54123	Irf7
171245	Vmn1-ps103	319164	Hist1h2ac	231238	Sel1f3	18610	Pdyn	13193	Dcx	107526	Gimap4	76933	Ifi2712a
230500	Efcab7	53603	Tslp	268903	Nrip1	19301	Pxmp2	14598	Ggt1	107575	Tcrg-C3	99899	Ifi44
14427	Gair1	56094	Ct8	269211	BC035947	22779	Ikzf2	14657	Gira4	114652	Ly6g5c		
66042	Sostdc1	72349	Dusp3	320332	Hist4h4	23871	Ets1	15129	Hbb-b1	219131	Phf11		
223337	Ugt3a2	27493	A230006K03Rik	14940	Gznc	26945	Tpsg1	15434	Hoxd3	226040	E030010A14Rik		
93672	Il24	66910	Tmem107	16814	Lbx1	50709	Hist1h1e	15958	Ifi2	231602	P2rx2		
243979	Mrgprb2	57390	Psors1c2	68992	Zfp580	53603	Tslp	15959	Ifi3	233187	Lim2		
230809	Cdca2	72543	Rnf165	72469	Picd3	66059	Krtcap2	16526	Konk2	236312	Pyhin1		
21907	Pdik1l	76703	Cpb1	28200	Dhrs4	74320	Wdr33	16638	Klra7	238205	Lfn5		
211232	Nr2e1	17537	Meis3	66223	Mip35	74513	Neto2	16899	Krtap13	240921	Gm4955		
384534	Cpne9	68291	Mto1	72759	Tmem135	75560	Ep400	16876	Lhx9	246728	Oas2		
67407	Vmn2f52	216739	Acs16	170771	Kndrbs2	93675	Clec2i	17857	Mx1	258096	Olfir112		
22779	Cy1c1	68888	Gkn3	17878	Myf6	105727	Sic38a1	20555	Sfn1	258276	Olfir960		
234797	Ikzf2	18610	Pdyn	319160	Hist1h4k	107589	Myk	20558	Sfn4	258434	Olfir934		
241201	6430548M08Rik	27280	Phlda3	67269	Agtpbp1	108912	Cdca2	20701	Serpina1b	258701	Olfir401		
107589	Cdh7	13123	Cyp7b1	67768	Neamt1	109620	Dsp	22169	Cmpk2	258706	Olfir43		
109620	Myk	245572	Tbx22	230103	Npr2	208836	Fanci	23960	Oas1g	258715	Olfir421		
24099	Dsp	258478	Olfir183	258616	Olfir357	319159	Hist1h4j	23962	Oas2	259062	Olfir667		
108912	Tnfrsf13b	30052	Pcsk1n	12695	Inadl	319164	Hist1h2ac	27371	Sh2d2a	271813	Agbl2		
215160	Rhbdd2	71177	4933424B01Rik	72085	Osgep1	320332	Hist4h4	54123	Irf7	545156	Kalrn		
258610	Olfir307	105727	Sic38a1	57271	Olfir1509			57249	Gabrq	545384	BC094916		
17268	Meis1	66059	Krtcap2	57321	Terf2ip			58203	Zbp1	665189	Gm7536		
71267	Cpvl	208836	Fanci	57773	Wdr4			59049	Sic22a17	667370	I830012O16Rik		
140476	Strc	12144	Blm	68725	110032F04Rik			64335	Svs3a	667373	Gm14446		
170786	Cd209a	22068	Trpc6	76792	2410131K14Rik			67896	Ccdc80	791292	Gm9936		
77766	Elp4	67223	Rip15	72068	Cno12			67935	Ces5a				
67638	4930483J18Rik	319159	Hist1h4j	76815	Calcoco2			68519	Eml1				
277753	Cyp4a12a	19364	Rad51l3	83486	Rbm5			69314	Izumoz3				
407800	Ecm2	67847	Sncalp	99526	Usp53			69481	Actl9				
67713	Dnajc19	74186	Ccdc3	12832	Col5a2			70061	Srf9c7				
12647	Chat	107971	Frs3	14134	Fcnp			70163	2210415F13Rik				
81898	Sf3b1	232984	B3gm18	52679	E2f7			70950	4921528I01Rik				
77706	Abcb5	13611	S1pr4	72772	Rint1			71132	Cabyr				
252868	Odf4	68172	Rpl39l	75560	Ep400			74055	Plec1				
26945	Tpsg1	74320	Wdr33	170738	Kcnh7			74100	Arpp21				
74513	Neto2	50709	Hist1h1e	20167	Rtn2			74933	4930469G21Rik				
15446	Hpgd	74399	4933403O03Rik	74025	Nphp3			75141	Rasd2				
52463	Tet1	67308	Mrp146	74062	Speer8-ps1			76933	Ifi2712a				
17229	Tpsb2	69149	Ktbd3	114565	Zfp295			78634	1700094C09Rik				
624245	Speer4e	545909	Vmn2f39	105835	Sgsm3								

Tableau S2.3 Genes uniquely and commonly downregulated by TALE factors

Supplementary Table 2.3. Genes uniquely modulated in *Meis1* or *Pknox1* expressing cells

Down in <i>MEIS1</i>		Down in <i>Pknox1-MC and Meis1</i>		Down in <i>Pknox1</i>		Down in <i>MC and Pknox1</i>	
Entrez gene	Symbol	Entrez Gene	Symbol	Entrez Gene	Symbol	Entrez Gene	Symbol
12655	Chi3l3	12655	Chi3l3	12752	Cln3	13586	Ear1
13349	Darc	18647	Cdk14	13586	Ear1	14225	Fkbp1a
13591	Ebf1	20201	S100a8	14030	Ewsr1	17195	Mbl2
18647	Cdk14	21810	Tgfb1	14225	Fkbp1a	18145	Npc1
20201	S100a8	74191	P2ry13	14255	Flt3	19038	Ppic
20210	Saa3	104183	Chi3l4	17195	Mbl2	20307	Ccl8
21810	Tgfb1	327978	Slfn5	18145	Npc1	20861	Stfa1
74191	P2ry13			18671	Abcb1a	53626	Insm1
104183	Chi3l4			19038	Ppic	68031	Rnf146
116837	Rims1			20307	Ccl8	71521	Pds5a
269587	Epb4.1			20861	Stfa1	72349	Dusp3
327978	Slfn5			22068	Trpc6	80744	Cwc22
				22359	Vldlr	93725	Ear10
				27047	Omd	170656	Krtap16-7
				53626	Insm1	240354	Malt1
				64945	Cldn12	240638	Slc16a12
				66910	Tmem107	242341	Atp6v0d2
				68031	Rnf146	279572	Tlr13
				71521	Pds5a	331004	Slc9a9
				72349	Dusp3	503845	Ear12
				75547	Akap13		
				76117	Arhgap15		
				78078	9230108115Rik		
				80744	Cwc22		
				93725	Ear10		
				105727	Slc38a1		
				114871	Psg28		
				170656	Krtap16-7		
				170757	Elt1		
				235344	Sik2		
				240354	Malt1		
				240638	Slc16a12		
				242341	Atp6v0d2		
				258886	Olfr1299		
				279572	Tlr13		
				319887	E030030I06Rik		
				331004	Slc9a9		
				434864	Gm15107		
				503845	Ear12		
				619991	Gm6121		

2.11 Acknowledgements

The authors thank Mélanie Fréchette, Andrea Mejia Alfaro and Angèle Fournier for their assistance with the animal care and transplantation experiments, Nadine Mayotte and Simon Girard for their excellent technical assistance, and Jalila Chagraoui for editing the manuscript. We also thank Danièle Gagné from the Flow Cytometry Facility of IRIC for assistance in FACS analysis, Christian Charbonneau from the Bio-imaging Facility of IRIC for confocal microscopy assistance and Simon Drouin for microarray hybridization and scanning.

This work was supported by a grant from the Canadian Cancer Society #018478 (G.S). R.B. is recipient of C.I.H.R and Cole Foundation scholarships, and G.S. is a recipient of a Canadian Research Chair in Molecular Genetics of Stem Cells.

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

2.12 References

1. Argiropoulos B, Yung E, Humphries RK. Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev.* 2007;21(22):2845-2849.
2. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286(5439):531-537.
3. Rozovskaia T, Feinstein E, Mor O, et al. Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene.* 2001;20(7):874-878.
4. Imamura T, Morimoto A, Takanashi M, et al. Frequent co-expression of HoxA9 and Meis1 genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement. *Br J Haematol.* 2002;119(1):119-121.
5. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002;30(1):41-47.
6. Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, et al. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia.* 1999;13(12):1993-1999.
7. Burglin TR. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(21):4173-4180.
8. Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H, Antonarakis SE, Kamps MP. Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14553-14558.
9. Chang CP, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG, Cleary ML. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol Cell Biol.* 1997;17(10):5679-5687.
10. Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell.* 1997;91(2):171-183.
11. Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* 1999;13(8):946-953.
12. Saleh M, Huang H, Green NC, Featherstone MS. A conformational change in PBX1A

is necessary for its nuclear localization. *Exp Cell Res.* 2000;260(1):105-115.

13. Shanmugam K, Green NC, Rambaldi I, Saragovi HU, Featherstone MS. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19(11):7577-7588.
14. Shen WF, Rozenfeld S, Kwong A, Kom ves LG, Lawrence HJ, Largman C. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):3051-3061.
15. Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol.* 1999;19(7):5134-5142.
16. Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development.* 1999;126(22):5137-5148.
17. 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;17(13):3714-3725.
18. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol.* 2001;21(1):224-234.
19. Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol.* 2004;24(5):1907-1917.
20. Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W, 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;105(4):1456-1466.
21. Wong P, Iwasaki M, Somerville TC, So CW, Cleary ML. Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes Dev.* 2007;21(21):2762-2774.
22. Longobardi E, Iotti G, Di Rosa P, et al. Prep1 (pKnox1)-deficiency leads to spontaneous tumor development in mice and accelerates EmuMyc lymphomagenesis: a tumor suppressor role for Prep1. *Mol Oncol.* 2010;4(2):126-134.
23. Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer

stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood*. 2005;106(1):254-264.

24. Mamo A, Kros J, Kroon E, et al. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood*. 2006;108(2):622-629.

25. Argiropoulos B, Palmqvist L, Yung E, et al. Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3. *Exp Hematol*. 2008;36(7):845-859.

26. Ferretti E, Marshall H, Popperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F. Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development*. 2000;127(1):155-166.

27. Ferretti E, Villaescusa JC, Di Rosa P, et al. Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Mol Cell Biol*. 2006;26(15):5650-5662.

28. Goudet G, Delhalle S, Biemar F, Martial JA, Peers B. Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter. *J Biol Chem*. 1999;274(7):4067-4073.

29. Bailey JS, Rave-Harel N, McGillivray SM, Coss D, Mellon PL. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1. *Mol Endocrinol*. 2004;18(5):1158-1170.

30. Deneault E, Cellot S, Faubert A, et al. A functional screen to identify novel effectors of hematopoietic stem cell activity. *Cell*. 2009;137(2):369-379.

31. Kros J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity*. 2003;18(4):561-571.

32. Chagraoui J, Niessen SL, Lessard J, et al. E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev*. 2006;20(15):2110-2120.

33. Kros J, Mamo A, Chagraoui J, et al. A mutant allele of the Swi/Snf member BAF250a determines the pool size of fetal liver hemopoietic stem cell populations. *Blood*. 2010;116(10):1678-1684.

34. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*. 2003;4(5):P3.

35. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
36. Huang H, Rastegar M, Bodner C, Goh SL, Rambaldi I, Featherstone M. MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(11):10119-10127.
37. Goh SL, Looi Y, Shen H, et al. Transcriptional activation by MEIS1A in response to protein kinase A signaling requires the transducers of regulated CREB family of CREB co-activators. *J Biol Chem.* 2009;284(28):18904-18912.
38. Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol Cell Biol.* 2006;26(10):3902-3916.
39. Berthelsen J, Zappavigna V, Ferretti E, Mavilio F, Blasi F. The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* 1998;17(5):1434-1445.
40. Pineault N, Buske C, Feuring-Buske M, et al. Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood.* 2003;101(11):4529-4538.
41. Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, et al. c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood.* 2006;108(1):297-304.
42. Kumar AR, Li Q, Hudson WA, et al. A role for MEIS1 in MLL-fusion gene leukemia. *Blood.* 2009;113(8):1756-1758.
43. Argiropoulos B, Yung E, Xiang P, et al. Linkage of the potent leukemogenic activity of Meis1 to cell-cycle entry and transcriptional regulation of cyclin D3. *Blood.* 2010;115(20):4071-4082.
44. Micali N, Ferrai C, Fernandez-Diaz LC, Blasi F, Crippa MP. Prep1 directly regulates the intrinsic apoptotic pathway by controlling Bcl-XL levels. *Mol Cell Biol.* 2009;29(5):1143-1151.
45. Cerignoli F, Rahmouni S, Ronai Z, Mustelin T. Regulation of MAP kinases by the VHR dual-specific phosphatase: implications for cell growth and differentiation. *Cell Cycle.* 2006;5(19):2210-2215.
46. Hawley RG, Fong AZ, Burns BF, Hawley TS. Transplantable myeloproliferative disease induced in mice by an interleukin 6 retrovirus. *J Exp Med.* 1992;176(4):1149-1163.

CHAPITRE 3. Development of a novel BRET-based assay to characterize the leukemic MEIS-PBX heterodimerization in living cells

Richard Bisailon¹, Eva Schmidt¹, Simon Girard¹ and Guy Sauvageau^{1,2,3,*}

¹Laboratory of Molecular Genetics of Stem Cells, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ²Faculty of Medicine, Montreal, QC, Canada; ³Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada

***Corresponding author:**

Guy Sauvageau, M.D., Ph.D., Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

3.1 Contribution des co-auteurs

Ce chapitre s'intéresse d'abord à l'expression des HOX/MEIS/PBX dans les leucémies myéloïdes aigües à caryotype normal. Le travail présenté ici rapporte également le développement d'un essai de BRET qui a permis de caractériser le domaine d'interaction entre MEIS et PBX en plus de mener à l'identification d'une vingtaine d'antagonistes potentiels de leur dimérisation.

RB: Design expérimental, réalisation des expériences, analyse des données, rédaction du manuscrit

ES: Réalisation des expériences (Figure S3.2; 100%)

SG: Réalisation des expériences (Figure 3.4; 25%)

GS: Design expérimental, supervision de la rédaction

Les travaux présentés dans ce chapitre sont prêts à être soumis pour publication.

3.2 Résumé

L'expression anormale des gènes *HOX*, *MEIS* et *PBX* représente l'une des anomalies moléculaires les plus fréquentes dans les leucémies humaines, notamment dans celles présentant des translocations chromosomiques MLL ou une mutation dans le gène NPM1. Des études génétiques effectuées chez la souris impliquent directement le produit protéique de ces gènes dans la leucémogénèse et révèlent que l'accélération du développement des leucémies *Hox* par MEIS1 est dépendante de sa capacité à hétérodimériser avec les co-régulateurs PBX. Dans cette étude, nous confirmons les niveaux d'expression élevés des gènes HOX et de PBX3 à partir de transcriptomes séquencés par RNA-seq de 49 patients leucémiques à caryotype normal (CN). Nous corrélons ensuite ces niveaux d'expression avec un pronostic défavorable. Nous rapportons également le développement d'un nouvel essai de BRET permettant la détection de l'interaction MEIS-PBX dans des cellules vivantes. Nous démontrons ensuite de quelle manière cet essai peut être exploité pour : 1) identifier de nouveaux résidus impliqués dans l'hétérodimérisation; et 2) réaliser un criblage à haut débit de petits inhibiteurs chimiques. Ensemble, nos travaux renforcent le rôle critique joué par le complexe HOX/MEIS/PBX dans les leucémies CN humaines et représente l'une des premières tentatives d'inhibition de l'interaction protéine-protéine (PPI) MEIS-PBX avec pour objectif de développer des thérapies ciblées pertinentes pour une grande proportion de patients leucémiques.

3.3 Summary

Deregulated expression of HOX, MEIS and PBX genes represents one of the most frequent molecular anomalies in human leukemia, most prevalently in those presenting a MLL-chromosomal translocation or an NPM1c mutation. Mouse genetic studies directly implicated these gene products in leukemia development and revealed that the MEIS1-induced acceleration of HOX leukemias was dependent on the heterodimerization with PBX cofactors. In this study we confirm the elevated expression levels of HOX genes along with PBX3 using RNA-seq of transcriptomes from 49 cytogenetically normal (CN) acute myeloid leukemia patients. We further correlate their expression levels with adverse prognosis. We also report the development of a novel BRET-based assay that allows robust monitoring of the MEIS1-PBX1 interaction in living cells. We then demonstrate how this assay can be exploited to: 1) identify new critical residues involved in the heterodimerization; and 2) perform a high-throughput screen of small molecule inhibitors. Overall our work reinforces the critical roles played by the HOX/MEIS/PBX network in human CN leukemias and represents one of the first attempts at inhibiting the MEIS-PBX protein-protein interaction (PPI) with the objective to develop targeted therapies relevant for a large proportion of leukemia patients.

3.4 Introduction

Deregulation of HOX/MEIS/PBX genes has become a transcriptional hallmark of a large proportion of cytogenetically normal (CN) and abnormal (CA) acute myeloid leukemias (AML). Various AML subtypes with distinct genetic anomalies (NPM1 mutation, MLL- and NUP-translocations, etc.) have all been correlated with abnormal expression levels of these homeobox genes (reviewed in ¹). Their expression signature also offer a reliable prognostic marker that is especially useful in the intermediate CN-AML category for which the prognostic value of mutations in RUNX1, CEBPA, DNMT3A, IDH1/2, ASXL1, NPM1 or FLT3 in patient risk stratification is still being investigated.²⁻⁴ Mouse genetic studies additionally indicated that HOX, MEIS and PBX proteins are essential effectors for a subset of MLL-translocation products during transformation.⁵⁻⁷ Given that HOXA9 and MEIS1 genetically synergize to generate aggressive acute myeloid leukemias in mouse models,^{8,9} it has become clear that these homeoproteins represent critical players in murine and human leukemogenesis.

MEIS1 is a member of the Three Amino acid Loop Extension (TALE) superclass of homeoproteins which includes PBX and PKNOX subfamilies and is characterized by an extra 3 amino acids in the loop between the 2 first helices of the DNA-binding homeodomain (HD).¹⁰ MEIS, PBX and a subset of HOX family members share the ability to form heterodimers or heterotrimers using non-overlapping interaction surfaces. MEIS-PBX, as well as PKNOX-PBX, protein-protein interaction (PPI) is mediated by the highly conserved bipartite Homothorax-MEIS (HM) and PBC domains, respectively,¹¹⁻¹³ and represents one of the 3 MEIS1 domains required for full acceleration of HOX-induced leukemogenesis, along with the HD and the transactivating C-terminal domain (CTD).^{5,14-16} The CTD holds transcriptional activation potential and can be explanted onto a non-transforming PKNOX1 protein to make it pro-leukemic,¹⁷ whereas the HD targets MEIS1 onto numerous genomic sites, most of which present enhancer-like features.^{18,19}

Using bone marrow (BM) *in vivo* transplantation assay we previously showed that the MEIS1 implication in leukemia required its interaction with PBX proteins. Indeed MEIS1 and PBX1 mutants with their respective HM and PBC domain swapped can still promote HOX-induced leukemogenesis whereas this phenotype is lost if the mutant MEIS1 moiety is expressed alone.¹⁵ This experiment strongly suggests that the MEIS-PBX heterodimer is also critical in human leukemias.

The heterodimerization of MEIS and PBX occurs in the cytoplasm and results in the sta-

bilization and nuclear translocation of the complex.²⁰⁻²³ Once in the nucleus these proteins tend to assemble as various heterodimers with HOX proteins (MEIS/PBX, MEIS/HOX, PBX/HOX) and can even form HOX/MEIS(PKNOX1)/PBX trimers on DNA target sites. The Homothorax-Meis bipartite domain (HM^A-HM^B) mediates the interaction with the PBX protein family partly through two leucine-rich (83-LFPLL-87 and 156-LLEL-159) alpha helix secondary structures and it was reported that a few residues within these subdomains were critical for the heterodimerization with PBX proteins.^{12,14} Unfortunately no exhaustive mutagenesis studies were performed on the entirety of this domain using a direct readout.

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) is a powerful non-invasive tool that allows precise monitoring of PPI in living cells. It relies on the excitation/emission spectra overlap between a bioluminescent energy donor (e.g. luciferase) and a fluorescent energy acceptor (e.g. GFP). For an efficient energy transfer, both donor and acceptor, when fused to protein partners, have to be localized in close proximity (<100 Å).²⁴ Since its early application at the end of the 1990's in the demonstration of homodimerization of the KaiB circadian clock protein,²⁵ it has been used to report numerous PPIs, including intramolecular conformational changes and GPCR dimerization,^{26,27} and has been derived into numerous novel applications including small-molecule screening,²⁸ cellular localization of interaction and *in vivo* imaging (reviewed in ²⁹).

The high prevalence of the HOX/MEIS/PBX signature in human leukemias along with their functional collaboration based on mouse models call for a greater understanding of their interaction dynamics as well as for development of targeted therapies. We confirm in this study the presence of this gene signature in our cohort of CN-AML using the RNA-seq technology. We also report the successful development of a BRET-based assay that allows the monitoring of the MEIS-PBX heterodimerization in living cells. We further exploited this new tool to exhaustively characterize the MEIS1 interaction surface when complexed to PBX and also to demonstrate the feasibility of a high-throughput screen of a small-molecule library with the objective of identifying new drugs capable of targeting the HOX/MEIS/PBX leukemias.

3.5 Material and methods

Patient samples

The AML and normal bone marrow samples comprised in the Leucégène data set were collected and analysed by the Québec Leukemia Cell Bank with an informed written consent and approval of the project by the Research Ethics Board of the Maisonneuve-Rosemont Hospital and Université de Montréal as described.³⁰ Human cord blood samples were collected from healthy volunteers by Héma-Québec with an informed written consent and approval of the project by the Research Ethics Board of Ste-Justine Hospital and Université de Montréal as described.³¹ HSC-enriched population was obtained by pooling cells sorted with CD34⁺ (n=5) and CD34⁺CD45RA⁻ (n=12) surface markers (as described in Fares, I. et al., *Science* (2014) Accepted).

RNA-seq

RNA-seq was performed as described.³⁰ The data discussed herein have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE48173 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE48173>). All expression values are expressed as Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM).

Animals

(C57Bl/6-Ly5.1 x C3H/HeJ) F1 congenic donor and recipient mice were bred in the I.R.I.C. specific pathogen-free (SPF) animal facility. Animal handling respected the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (C.C.A.C.) and the experimental procedures were approved by the Deontology Committee on Animal Experimentation (C.D.E.A.) of the Université de Montréal.

Plasmids

For the BRET biosensors, MEIS1 and MEIS1 Δ PIM (EcoRI + NotI) cDNA¹⁵ were amplified by PCR and introduced into pcDNA3.1-Hygro backbone (Invitrogen) downstream and in-frame of the *Renilla* Luciferase II cDNA³² cassette (KpnI + BamHI). PBX1a cDNA¹⁵ (BamHI + EcoRI) was amplified by PCR and introduced into pGFP2-Zeo (Perkin Elmer) downstream and in-frame of the GFP10 cDNA³³ cassette. For *in vivo* functional validation, the LUC-MEIS1 and LUC-MEIS1 Δ PIM cassettes (HindIII/blunt + XhoI) were subcloned into the retroviral pMSCV-pgk-YFP (HpaI + XhoI) plasmid.³⁴ HOXA9 expression vector (#654) was generated by ex-

tracting HOXA9 cDNA (#320)⁸ (HindIII/blunt) and subcloning into pMSCV-pgk-GFP (#652)⁹ (EcoRI/blunt). GFP and PKNOX1 retroviral vectors consisted of pMSCV-pgk-GFP (#652) and pMSCV-PKNOX1-pgk-GFP (#2643) and were already described elsewhere.^{9,17} All constructs were validated by sequencing and western blotting. Additional details on construction of vectors and primer design are available upon request.

The HM alanine stretch mutants were obtained by subcloning designed gBlocks Gene fragments (Integrated DNA Technologies) digested with BamHI into the LUC-MEIS1 cassette with a modified HM domain flanked by BamHI sites.¹⁵ The upstream BamHI site between the LUC and MEIS1 cDNA had to be destroyed by subcloning the N-terminal portion of MEIS1 amplified with a BglII site-containing forward primer 5'-ATTCATAGATCTACTAGTAACGGCCGCC-3' and a reverse primer that begins at the HM 5'-CACTGTCTGATTTGGATCCTCC-3'. gBlocks sequences are available upon request.

Bone marrow cell culture, retroviral infection and transplantation

Retrovirus production from GP+E86 cells, primary bone marrow cell infections and tail-vein transplantations were performed as previously described.³⁵ Upon retroviral transduction of Lin⁻ BM cells, a bulk of 2×10^5 cells were transplanted along with 2×10^5 helper cells.

Immunoprecipitation and western blotting

Cyto-nucleoplasmic protein extracts were prepared using CSK buffer as described.³⁰ Primary antibodies used in this study include MEIS,¹⁵ GFP (Santa Cruz #SC-9996) and TUB α (Cell Signaling Technology #2144). Secondary anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. For immunoprecipitation 600 μ g of protein extract were incubated overnight at 4°C with 0.6 μ g of GFP antibody and 25 μ L of protein G-coated agarose beads (Santa Cruz) before undergoing 4 washes with extract buffer. Beads were recovered in 1x Laemmli buffer.

BRET assay

HEK293T cells (Sigma-Aldrich) were maintained in 10% FBS-supplemented DMEM with penicillin-streptomycin. Cells were transfected at a 40-50% confluency using P.E.I. (typically [250 ng LUC-MEIS1 + 50 ng GFP-PBX1] + 17 μ L P.E.I. (1 mg/mL) for 100-mm plate (BD Biosciences) for 15 minutes at room temperature). Forty-eight hours after transfection cells were tryp-

sinized, washed in PBS, resuspended in Tyrode's buffer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.42 mM NaH₂PO₄, 1.7 mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃ and 5 mM glucose), counted and seeded at 5x10⁴ cells per well in 96-well white opaque microtiter plate (BD Biosciences). Total GFP measurements were obtained using an EnVision (Perkin Elmer) plate reader (Em : 400 nm ; Ex : 510 nm) and the BRET ratio was calculated using the luminescence and fluorescence counts read 6 minutes following addition of 2.5 μM Deep Blue C substrate (Biotium) using a SpectramaxL luminometer (Molecular Devices) (donor: 480nm ± 20 nm; acceptor: 530 nm ± 20 nm). The BRET ratio is calculated by dividing the GFP signal upon addition of Deep Blue C substrate by the luciferase signal.

High-throughput screening

A similar procedure was followed for the HTS and included plating of 12.5x10⁶ cells per Cell-stack (Corning, Sigma-Aldrich) 72 hours prior to transfection. Cells were transfected with 35 μg of LUC-MEIS1 + 11.9 μg of GFP-PBX and 381.6 μg of P.E.I. in 15 mL Opti-MEM (Gibco, Life Technologies). The cells were harvested forty-eight hours later, washed with PBS, resuspended in HBSS buffer (Wisent Bioproducts) and seeded at 5x10⁴ cells per 40 μL per well in 384-well microplates (Greiner Bio-one) using a Multidrop apparatus (Thermo Scientific). Compounds were then added using a 384-tips pin tool to reach a final concentration of 10-20 μM (0.25 μL, 0.5% final DMSO concentration) before plates were incubated for 2 hours at 37°C in an automated CytoMat incubator. Six minutes upon addition of Deep Blue C substrate measurements were performed as described above. The compound library was provided by the I.R.I.C. HTS facility and was obtained from various sources (<http://www.iric.ca/en/research/core-facilities/high-throughput-screening/?section=technologies/>). The robotic procedure was performed using a Biomek liquid handler and the SAMI software provided workspace coordination.

LUMIER

The assay was performed as described previously.³⁶ Briefly 2x10⁶ HEK293 cells, maintained in 10% FBS-supplemented DMEM, were seeded in 100-mm plate 24 hours before being transfected with 8 μg of LUC-MEIS1 and 4 μg of GFP-PBX1 with 17.7 μL of P.E.I. (1 mg/mL). Forty-eight hours post-transfection cells were trypsinized, washed with PBS, resuspended in Tyrode's buffer and seeded in 0.5 mL 96-well microblock (Greiner Bio-one) at 5x10⁵ cells per 400 μL. Upon a 2 hour-incubation period at 37°C cells were washed twice with PBS, incubated for 10

minutes on ice in 150 μ L lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40 and 2 mM EDTA) and spun for 12 minutes at 1000xG. Supernatants were transferred into Costar 96-well plates (Corning, Sigma-Aldrich) with snap lid and incubated with rotation for 2 hours at 4°C with 500 ng of GFP antibody (Santa Cruz #SC-9996). Upon an additional 2-hour incubation period at 4°C with 15 μ L of Protein G-coated magnetic beads (Life Technologies), samples were washed 4 times with lysis buffer prior to beads resuspension in 100 μ L of Tyrode's buffer. Half the volume was transferred into a white opaque 96-well microtiter plate already containing 50 μ L of Tyrode's buffer and 2.5 μ M of Deep Blue C substrate was added immediately before luminescence reads were acquired using the EnVision apparatus (Em: 400 nm).

Cell viability

Following incubation with compound B (Maybridge) or DMSO, cells were washed twice and incubated with AnnexinV-Alexa 350 (Invitrogen) and processed by FACS according to the manufacturer's protocol.

Chemical

The compound B, or 2-({[5-[4-(tert-butyl)phenyl]-2-(methoxycarbonyl)-3-thienyl]amino} carbonyl)benzoic acid, was purchased from Maybridge.

Statistical analysis

Mann-Whitney U-test (RPKM fold change), log-rank test (survival) and Pearson's correlation were used for the analyses on human samples. Non-linear regression (one-site hyperbola), sigmoidal dose-response and Student's T-test were used for BRET experiment comparisons. All analyses were performed using the GraphPad Prism 4.03 software.

3.6 Results

CN-AML rely on the HOX/MEIS/PBX network

The transcriptome of 49 cytogenetically normal AML patients was made available to us through the Leucégène Project and was obtained by RNA-seq as previously described.³⁰ To serve as a healthy transcriptome reference, 17 cord blood (CB) samples enriched in hematopoietic stem cells (HSC) using the CD34⁺ marker and total healthy bone marrow samples were also sequenced. To identify genes abnormally expressed in human leukemias, a transcriptome comparison between primary human CN-AML samples and healthy CD34⁺ cells was performed with a fold change analysis using genes expressed on average at 1 RPKM in at least one of the two populations. Two of the most significantly upregulated genes in CN-AML were HOXB8 and HOXB9 with fold change corresponding to 2427 ± 1780 and 152 ± 73 , respectively (Fig. 3.1A; left panel). Interestingly the known HOX-interacting protein PBX1 was dramatically and significantly downregulated at the transcript level by 118 ± 44 fold in leukemic samples (Fig. 3.1A; left panel). The high coefficient of variation (C.V.) for the majority of these genes (HOXB8: 0.73; HOXB9: 0.48; PBX1: 0.37) reflects the broad range of expression levels that are detected in the AML samples (Fig. 3.1A; right panel), supporting the notion that CN-AML are clinically and genetically heterogeneous diseases.

Given that HOX and PBX are genetic and protein collaborators and have been previously linked to leukemia development, we decided to explore the transcriptional behaviour of the other HOX and TALE family members. In particular transcript levels of HOXA9, HOXB8, PBX3 and PKNOX1 were significantly higher CN-AML compared to CB HSC whereas MEIS1, PBX1 and PBX2 followed the opposite trend (Fig. 3.1B). The HNRNPL gene, which expression was previously shown to be constant in various tissues, was equally detected in each condition (Fig. 3.1B).³¹ We also found that most of the HOXA and HOXB gene clusters were more expressed in leukemic cells compared to healthy CD34⁺ cells, whereas HOXC and HOXD genes were not detectable in any of our samples (Supplementary Fig. 3.1). Overexpression of HOXA genes is also a feature of MLL-induced leukemias.³⁷ When comparing the average expression levels of HOX and cofactors between the CN and the MLL-AML, also from the Leucégène cohort (n=32), a significant increase in transcript levels of PBX3 and HOXA9, as well as a small increase that did not reach statistical significance for MEIS1, was detected in the MLL samples (Fig. 3.1B; red bar).

We next wondered if a correlation could be established between expression levels of

HOX/MEIS/PBX and the clinical outcome of CN-AML patients. By performing a simple univariate survival analysis with patients aged 60 or under that underwent induction treatment (n=38), a strong correlation was drawn between high expression of HOXB8, HOXA9, PBX3 and PKNX1 and poor overall survival (OS) (Fig. 3.1C), which validates recent prognostic studies based on HOX gene expression.^{3,4} Modulation of other genes such as MEIS1, PBX1 and the HNRNPL endogenous control could not be associated with any particular clinical outcome (Fig. 3.1C). In summary we showed that AML patients with a normal karyotype tend to over-express a subset of HOX genes along with their cofactor PBX3. Concurrently MEIS1 expression is slightly reduced while PBX1 is completely shut down. CN-AML patients also appear to do worst in treatment outcome when they express high levels of PBX3 and HOX transcripts.

Strong co-regulation of MEIS1/PBX3/HOX in human CN-AML

To further validate that this subset of homeobox genes function in a cooperative manner in leukemia, we sought to determine if their expression was coordinated in individual patients by performing a Pearson's correlation analysis. High coefficients of 0.91 (HOXA9 and MEIS1), 0.68 (HOXA9 and PBX3) and 0.76 (MEIS1 and PBX3) were calculated and confirmed the strong co-expression of these genes in CN-AML patients (Fig. 3.2A). In comparison the steady HNRNPL control gene has a correlation coefficient of 0.01 (HOXA9), 0.01 (PBX3) and 0.12 (MEIS1) (data not shown). Furthermore using this tool we confirmed previous studies that reported a strong relationship between bi-allelic CEBPA mutations as well as NPM1c mutations with low and high HOX/MEIS1 levels, respectively (Fig. 3.2A; reviewed in ³⁷).

To identify additional factors that could be part of the HOX/MEIS/PBX signature in CN-AML, we looked for the genes most highly correlated with PBX3 expression. As expected a subset of 5' HOXA genes were among the top 30 hits along with MEIS1 and other leukemia associated genes such as SMC4 and NKX2-3 (Fig. 3.2B).^{38,39} Importantly this expression pattern was confirmed using the larger TCGA AML dataset (n=149; data not shown).³⁹ These results suggest that these genes work in a cooperative and highly conserved manner during human leukemogenesis and further suggest that a subset of human CN-AML rely on coordinated expression of HOX/MEIS/PBX genes.

MEIS/PBX cellular function

These results fall in line with genetic mouse studies directly implicating these proteins in leu-

kemia development and further support their biological functions as protein complexes. Indeed MEIS and PBX form heterodimers in the cytoplasm which triggers nuclear translocation of the complex and bind DNA targets as dimer and/or as trimer with additional HOX partners (Fig. 3.3A). Of note MEIS1 is unable to collaborate with HOX genes in leukemogenesis when it lacks its HM domain (MEIS1 Δ PIM), suggesting that the MEIS-PBX PPI is critical for leukemogenesis and thus represents an interesting therapeutic target.

Functional validation of the engineered MEIS1 and PBX1 biosensors

We developed a BRET-based system that would allow the monitoring of the MEIS-PBX interaction in living cells with the objective to refine our current understanding of this PPI. The renilla Luciferase (RLuc2) and the green fluorescent protein (GFP10) variants of the BRET2 system were fused N-terminally of MEIS1 and PBX1, respectively (Fig. 3.3B).⁴⁰ PBX1 was chosen as the prototypical PBC class member and shares 94% sequence identity with PBX3 over the PBC domain. This combination of fusions was selected based on the higher BRET signal output compared to alternative N- or C-terminal fusion combinations (Supplementary Fig. 3.2). The MEIS1 mutant MEIS1 Δ PIM was likewise N-terminally fused to RLuc2 and served as a control for non-specific BRET signal. These new BRET biosensors migrated at the expected size (~60-75 kDa; Fig. 3.3C; two upper panels) and maintained the capacity to heterodimerize as determined by co-immunoprecipitation experiment (Fig. 3.3C; two lower panels). On the contrary LUC-MEIS1 Δ PIM was only minimally pulled-down by a GFP antibody, validating the impeded ability of this MEIS1 mutant to bind to PBX proteins (Fig. 3.3C; lower panels).

The biological relevance of the LUC-MEIS1 biosensor in leukemia development was further tested using a bone marrow transplantation assay. Mice reconstituted with [HOXA9+LUC-MEIS1]-transduced BM cells died of leukemia that developed significantly faster than the [HOXA9+LUC-MEIS1 Δ PIM]-reconstituted recipients (80 \pm 10 days compared to 275 \pm 50 days), although significantly later than the [HOXA9+ MEIS1]-recipients (Fig. 3.3D). Western blot analysis of total protein extracts of BM cells from reconstituted mice indicated that all protein products were detectable and migrated at the expected size (Fig. 3.3E). Overall these experiments confirmed the correct expression of the newly designed BRET biosensors and validated their functional relevance *in vitro* and *in vivo*.

The BRET biosensors provide a new and specific way to monitor MEIS1-PBX1 interaction

in living cells

The BRET biosensors were then tested in a donor-saturation assay (DSA). This assay monitors the BRET signal as the acceptor:donor (GFP:LUC) ratio gradually increases and is used to confirm that the BRET output stems from a specific PPI. Upon co-transfection of increasing amounts of GFP-PBX1 acceptor along with constant amount of LUC-MEIS1 Δ PIM, the BRET ratio increased linearly, which reflects non-specific interactions resulting from random collisions (Fig. 3.4A). On the contrary, the [LUC-MEIS1+GFP-PBX1] BRET titration curve showed a hyperbolic increase that rapidly reached a plateau, characterized by an estimated affinity index of 0.004 (Fig. 3.4A; BRET₅₀ value). This hyperbolic curve is indicative of a specific PPI.

To further validate the signal specificity, a BRET competition experiment was undertaken. Increasing amounts of untagged PBX1, or control LAMIN, were co-transfected into HEK293 cells along with constant amount of LUC-MEIS1 and GFP-PBX1. Addition of « cold » PBX1, but not LAMIN, lead to a decrease in the BRET ratio, suggestive of a specific interaction between the LUC-MEIS1 and GFP-PBX1 biosensors (Fig. 3.4B). In all, these experiments indicated that our newly designed BRET assay allows highly specific monitoring of the MEIS1-PBX1 dimerization in living cells.

Refining the MEIS1-PBX1 interaction domain

A sequence conservation analysis performed with 123 homologous sequences confirmed the high preservation of the two HM subdomains (K72-E103 and E140-D188) but also of a short peptidic sequence (S113-Q127) in between that is predicted to form a α helix secondary structure (Fig. 3.4C and data not shown). The highly conserved HM and PBC domains mediate the MEIS-PBX PPI but no systematic mutagenesis approach coupled with a direct readout has been performed to identify residues critical for this interaction. The MEIS-PBX BRET-based assay was thus exploited to evaluate the heterodimerization potential of a series of HM-mutated-LUC-MEIS1 with GFP-PBX1. The HM-mutants consisted of successive stretches of 10 consecutive amino acids replaced by alanines (Fig. 3.4D). The alanine substitutions were privileged over deletions to minimize potential conformational changes that could alter the respective orientation of the LUC and GFP sensors. Two additional mutants, depleted of either the HM^A or the HM^B subdomain, were included as they were previously reported to be essential for the MEIS-PBX interaction (Fig. 3.4D). All the engineered mutants migrated at the expected size as determined by western blot and were expressed at levels comparable to the original LUC-MEIS1 biosensor

(Fig. 3.4E).

Removing the core 83-LFPLL-87 and 156-LLEL-159, corresponding to the ALA02 and ALA09 mutants, respectively, resulted in a dramatic decrease in the BRET signal (87% and 71% reduction), a result which supports previous findings obtained from EMSA and co-immunoprecipitation experiments (Fig. 3.4F).^{12,14} Additionally the ALA08 mutant, located at the beginning of the HM^B α helix, also generated a weak BRET signal (76% inhibition; Fig. 3.4F). Furthermore we observed that substitution of the relatively well conserved sequence in-between both HM subdomains (ALA06-07 mutants) lead to ~50% inhibition of PBX1 binding (Fig. 3.4F). Finally removal of either HM subdomain resulted in a BRET ratio as low as the MEIS1 Δ PIM mutant (Fig. 3.4F). This result validates the experimental setup and confirms the requirement of both subdomains for the interaction.

A high throughput screen for inhibitors of the MEIS1-PBX1 dimers

The scalability and flexibility of the BRET assay was then exploited to setup a high-throughput screen of a small molecule library with the aim to identify novel PPI chemical inhibitors. It was established that the specific BRET signal was highly stable over a 4 hours incubation period (Supplementary Fig. 3.3) and tolerated a DMSO treatment up to a concentration of 0.5% (Supplementary Fig. 3.4). A Z-factor of 0.81 was also calculated and confirmed that the assay was robust enough to undergo high-throughput experimentation (Fig. 3.5A). The entirety of the IRIC compound library (~115K molecules) was screened and revealed 117 preliminary hits that efficiently reduced the BRET ratio above 50%, while minimizing perturbations of intrinsic fluorescence and luminescence signals below 75% (Fig. 3.5B). Of these, 32 compounds were confirmed (27%) from a different stock plate in the same experimental setup (data not shown).

The LUMIER assay was then selected as orthogonal screen to confirm the PPI inhibitory activity of the preliminary hits.³⁶ The assay detects the bioluminescent activity of LUC-MEIS1 in protein extracts upon immunoprecipitation of GFP-PBX1. Immunoprecipitation of GFP-PBX1 yielded 20 times more luminescence counts when co-expressed with LUC-MEIS1 than with LUC-MEIS1 Δ PIM (Fig. 3.5C; left panel). The comparable fluorescence counts confirmed that the same amount of GFP-PBX1 was pulled-down (Fig. 3.5C; right panel). Twenty-five out of the 32 preliminary hits were selected based on chemical structure and further subjected to the MEIS-PBX LUMIER assay. Most of the chemicals tested (23/25) inhibited the luminescence counts above 50% (2 examples shown in Fig. 3.5D). Dose-response experiments performed with

the LUMIER assay after a 2-hour incubation period established that compound B had an EC_{50} of $8.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (Fig. 3.5E). A LD_{50} of $36 \pm 2 \mu\text{M}$ was calculated as assessed by AnnexinV staining performed on HEK293 cells upon a 2-hour treatment (Fig. 3.5F), suggesting that compound B (Fig. 3.5G) inhibited MEIS1-PBX1 heterodimer formation at doses that were not toxic to cells. Overall, we showed that the MEIS-PBX BRET-based assay is highly flexible, robust and suitable for effective and rapid screening of small molecule libraries. We further demonstrated by using the LUMIER orthogonal assay that one of the preliminary hits represents a potential drug inhibitor capable of targeting the MEIS1-PBX1 protein complex.

3.7 Discussion

The study presented here exploits RNA-seq technology to monitor expression levels of HOX and cofactor genes in various healthy and leukemic cell populations. We found higher levels of these homeobox genes in diseased cells and correlated their expression with patient survival. Supporting previous transcriptome analyses performed by micro-array,⁴¹⁻⁴⁵ the abnormal HOX/PBX expression signature detected in our CN-AML cohort reflects a mechanistic feature that has now been correlated with over 20 recurrent chromosomal translocations detected in AML.¹ Furthermore the correlation between increased HOX/TALE expression and shorten survival is in accordance with recent prognostic reports that successfully exploited HOX/PBX/MEIS expression levels for patient risk stratification.^{3,4} Given how clinically and genetically heterogeneous AML diseases are, such a unifying molecular feature stands as a great therapeutic opportunity to treat a broad range of leukemia patients.

In this regard, we report here the development and exploitation of a fast and robust BRET-based assay as a tool to specifically monitor the MEIS-PBX interaction in living cells. We took advantage of the high reproducibility and flexibility of the assay to perform a systematic and quantitative mutagenesis study of the PPI surface. We confirmed the requirements of two leucine-rich regions located in both HM subdomains as well as the highly hydrophobic sequence at the beginning of the HM^B subdomain, possibly by perturbing the α helix secondary structure formation and stability.^{12,14} We also identified a relatively well-conserved sequence (ALA06) located between the two HM subdomains and demonstrated its relative contribution in heterodimer formation. Interestingly this sequence is also predicted to form a α helix secondary structure. On the contrary the sequence located within 161-190 (ALA11-ALA12), although extremely conserved, appeared to be dispensable for PBX heterodimerization, suggesting that these residues are involved in another evolutionary preserved function, in the recruitment of competing factors such as P160, for example.⁴⁶

PBX1 was chosen in this study to demonstrate the feasibility of our BRET assay. The PBC domain is almost 100% identical in all PBX family members.⁴⁷ Therefore if the preliminary candidates bind directly to the HM-PBC pocket, they would be expected to equally inhibit dimerization with other PBX proteins. Alternatively if the inhibition is allosteric, given the highly divergent N- and C-terminal PBX sequences, high PBX-specificity could be achieved, which would be of great interest to the field of hematology. Indeed, this study and others described the up-regulation of PBX3 in CN- and CA-AML when compared to healthy CD34⁺ BM cells.^{3,4} This

pattern strongly contrasts the PBX1 expression, which is high in normal immature BM cells and undetectable in CN-AML (Fig. 3.1A). The hypothesis suggesting that PBX1 and PBX3 have divergent role in hematopoiesis and leukemogenesis is currently debated. Mouse genetic studies suggest that PBX3 but not PBX1 over-expression can accelerate HOX-leukemogenesis.^{8,48} Conversely the leukemogenic potential of a MEIS1 mutant with a HM>PBC swapped domain is rescued when co-expressed with a PBX1 mutant with the respective PBC>HM swapped domain, suggesting that PBX1 also has the ability to cooperate with MEIS1 during leukemogenesis.¹⁵ Another difference involves the PBX1 capacity to directly regulate hematopoietic stem cell self-renewal, a feature not yet associated with PBX3.^{35,49-52} In this regard it will be important to address in parallel the relative PBX contribution to normal and leukemic hematopoiesis with careful monitoring of PBX expression level.

The reduced expression of MEIS1 in CN- and in MLL-leukemias compared to HSC-enriched hematopoietic cells challenges a plethora of studies reporting an upregulation of MEIS1 in cytogenetically normal⁴³ or abnormal AML.⁵³⁻⁵⁵ We believe this divergence stems from the use of various leukemia subtypes and/or committed progenitors as control populations (like cord blood in here). Alternatively other reports revealed a critical role for MEIS1 in normal^{56,57} and leukemia^{5,58} stem cells, suggesting that MEIS1 might be enriched in the more immature leukemia stem cells and downregulated during AML cell differentiation.

We describe herein one of the first attempt at disrupting the MEIS-PBX interaction by performing a high-throughput screen of a small molecule library. This simple BRET assay allowed the identification of over 20 preliminary hits that were subsequently confirmed using the LUMIER orthogonal assay. This work is consistent with recent efforts that targeted the HOX/MEIS/PBX network. These include the HOX-PBX small peptide inhibitor HXR9, as well as inhibitors indirectly targeting gene transcription, such as Entinostat (HDACi) and Flavopiridol (RNA Pol II), as well as GSK-3.⁵⁹⁻⁶¹ The highly regulated expression of these proteins and their implication in numerous biological processes including development, differentiation and cancer, have created a need for specific inhibitors. We think this work complements well these alternative inhibition strategies and should be beneficial for therapeutic treatment of a disease known for high relapse incidence and resistance acquisition. With this objective in mind, our preliminary hits will undergo multiple rounds of optimization through Structure-Activity Relationship (SAR). The more interesting candidates will then be tested on proliferation of human primary AML cells and in *in vivo* transplantation assays.

In summary we developed a formidable tool that monitors a critical PPI involved in leukemogenesis. We report preliminary experiments that shall lead to preclinical phase studies with the aim of developing new drugs to treat leukemia. Alternatively, our tool will be useful to expand our understanding of the biochemical association of these homeoproteins with themselves and with other protein partners involved in the mediation of their leukemogenic potential.

3.8 Figures

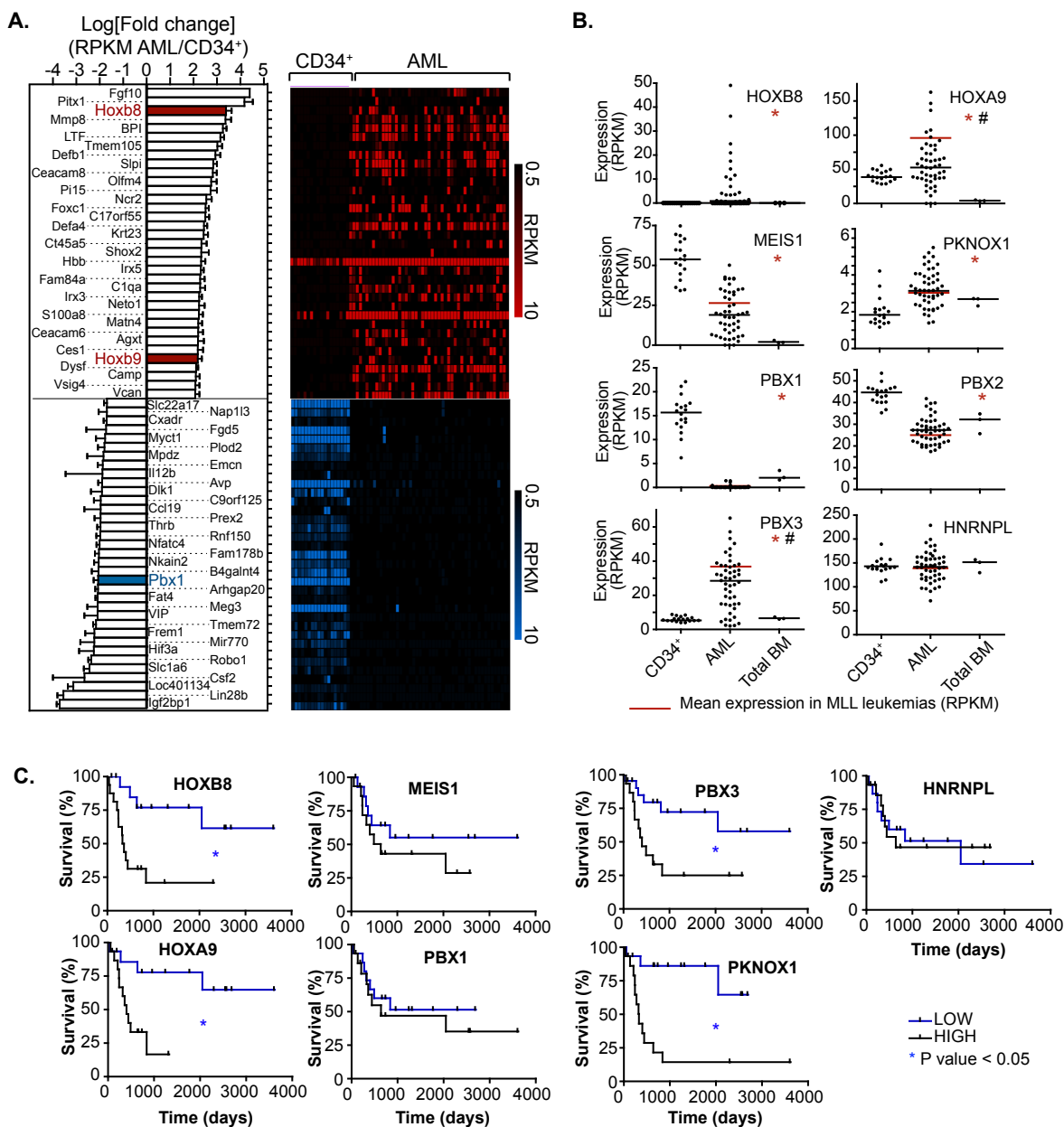


Figure 3.1 HOX/PBX/MEIS signature is prevalent in CN-AML and correlates with overall survival.

A) Left: The values of the 35 most differentially expressed genes between normal and AML cell populations as determined by dividing the mean RPKM value from CN-AML samples by normal CD34⁺ cells. Note the presence of 2 HOXB genes (red) and the cofactor PBX1 (blue) among the top genes most differentially expressed. Error bars represent S.E.M. * P value < 0.01 as determined by Mann-Whitney U-Test. Right: The RPKM value for the top

35 most differentially expressed genes in each condition is represented for every sample by heat-map using the M.E.V. software (TM4) to show the variability within each conditions. B) Detailed dot plot expression analysis of HOX and collaborator genes in CN-AML samples, CD34⁺ cells and total BM cells. Red bars indicate the mean expression of indicated genes in our cohort of MLL-AML. * = P value < 0.05 between CN-AML and CD34⁺ populations, and # = P value < 0.05 between MLL and CN-AML populations, as determined by Mann-Whitney U-Test. C) Survival curve representation of overall survival (OS) of patients separated according to their expression level of indicated gene. Significance of difference was tested using Log-rank test. Notches indicate censored events. * P value < 0.05.

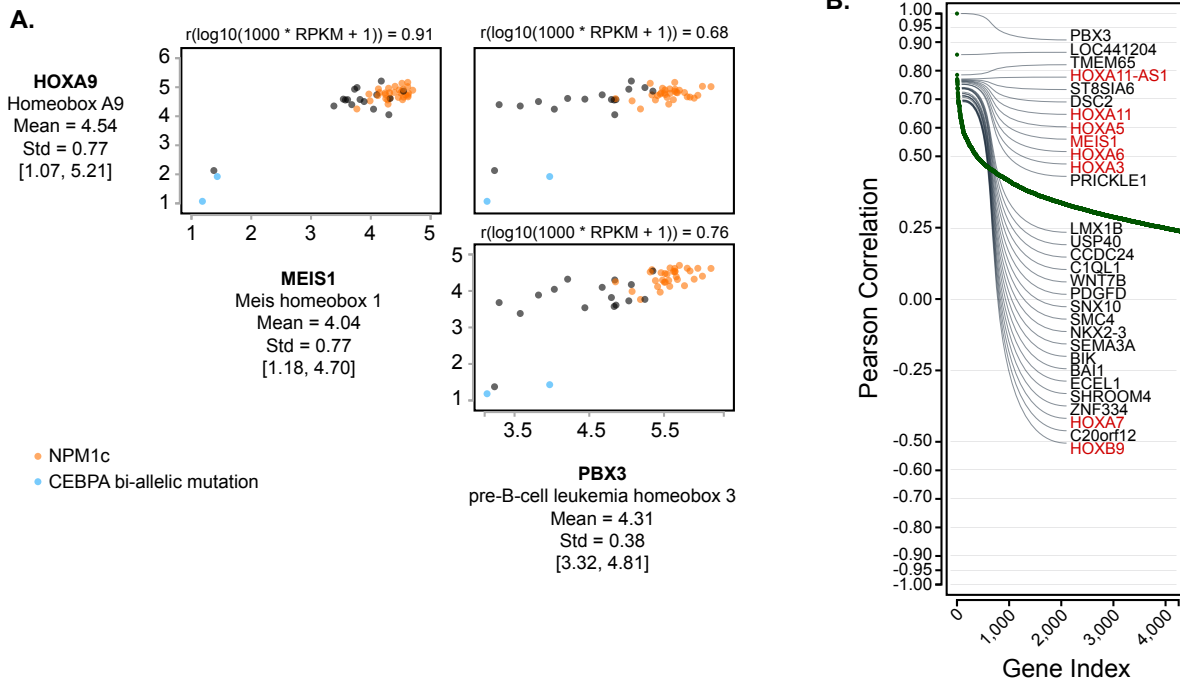


Figure 3.2 Coordinated expression of HOX/PBX/MEIS genes in CN-AML

A) Multi-way scatterplot analysis using $\text{Log}_{10}[\text{RPKM}]$ expression values from CN-AML patients ($n=49$) revealing a strong Pearson's correlation between MEIS1, PBX3 and HOXA9. CEBPA bi-allelic and NPM1c-presenting leukemias are represented by a blue and orange dot, respectively. **B)** Waterfall representation of the 30 genes most correlated (Pearson's) with PBX3 expression in CN-AML. Genes related to the HOX/MEIS/PBX signature are highlighted in red.

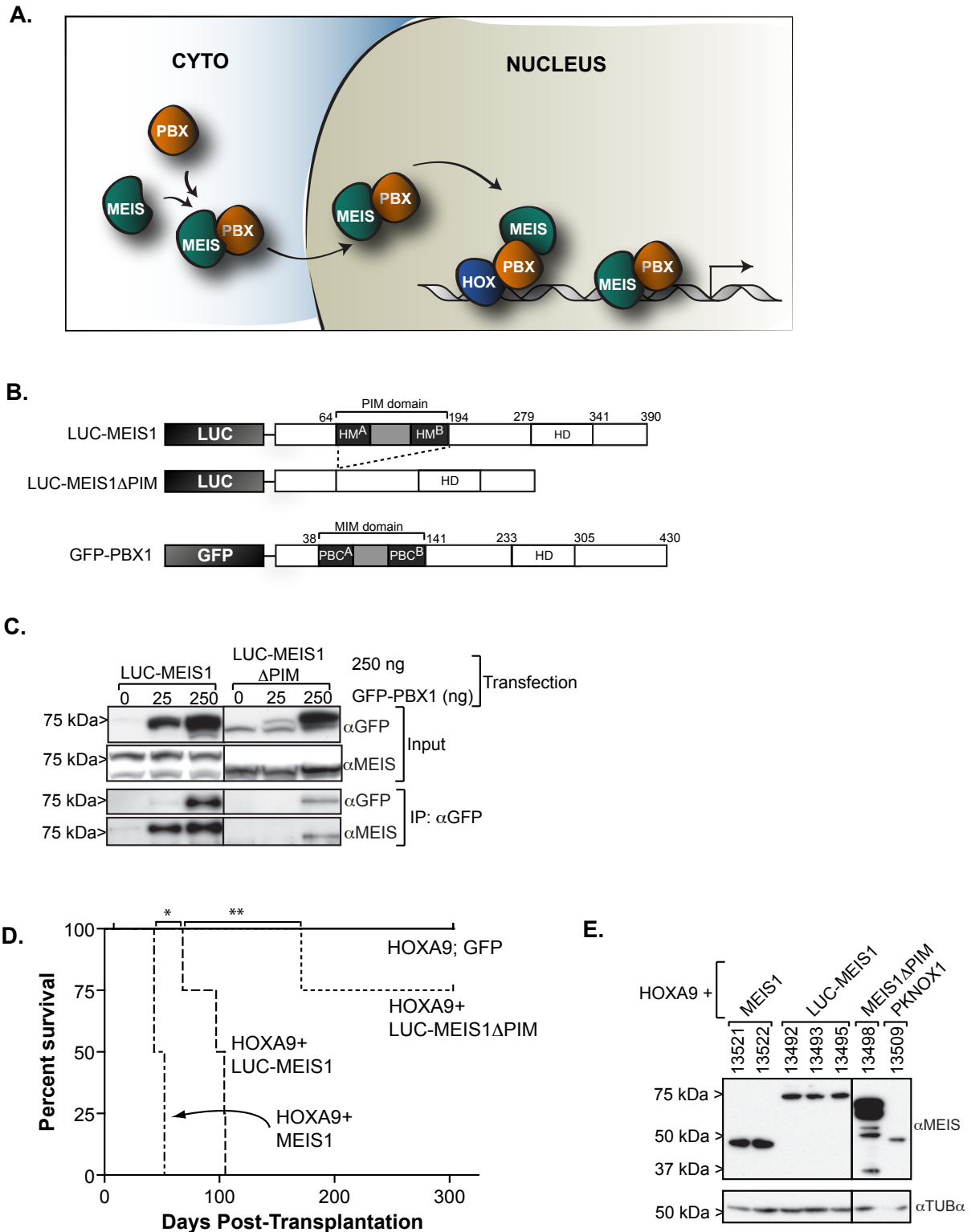


Figure 3.3 LUC-MEIS1 and GFP-PBX1 biosensors are functionally active and maintain the molecular function of their wild-type counterparts.

A) Schematic representation of MEIS1 and PBX1 cellular functions. B) Schematic re-

presentation of the engineered LUC-MEIS1, LUC-MEIS1 Δ PIM and GFP-PBX1 biosensors used in this study. C) Western blot analysis performed using cyto-nucleosplasmic (CN) cell extracts from HEK293 transfected with the indicated amount of biosensors cDNA and showing protein expression at the appropriate size (two upper panels). Co-immunoprecipitation of 600 μ g of CN extract using 0.6 μ g of GFP antibody revealed a strong immunoprecipitation of LUC-MEIS1 biosensor whereas LUC-MEIS1 Δ PIM was barely detectable when immunoprecipitation was carried out using the same procedure (two lower panels). D) Survival analysis of mice reconstituted with BM cells retrovirally transduced with the indicated genes. A total of 2×10^5 helper cells and 2×10^5 unsorted infected cells were transplanted into sub-lethally irradiated recipient mice. * P value = 0.02; ** P value = 0.007, as determined by Log-rank test. E) Western blot analysis of transduced MEIS1 mutants expression in BM cells of recipient mice at time of death (or end of experiment) using the indicated antibody.

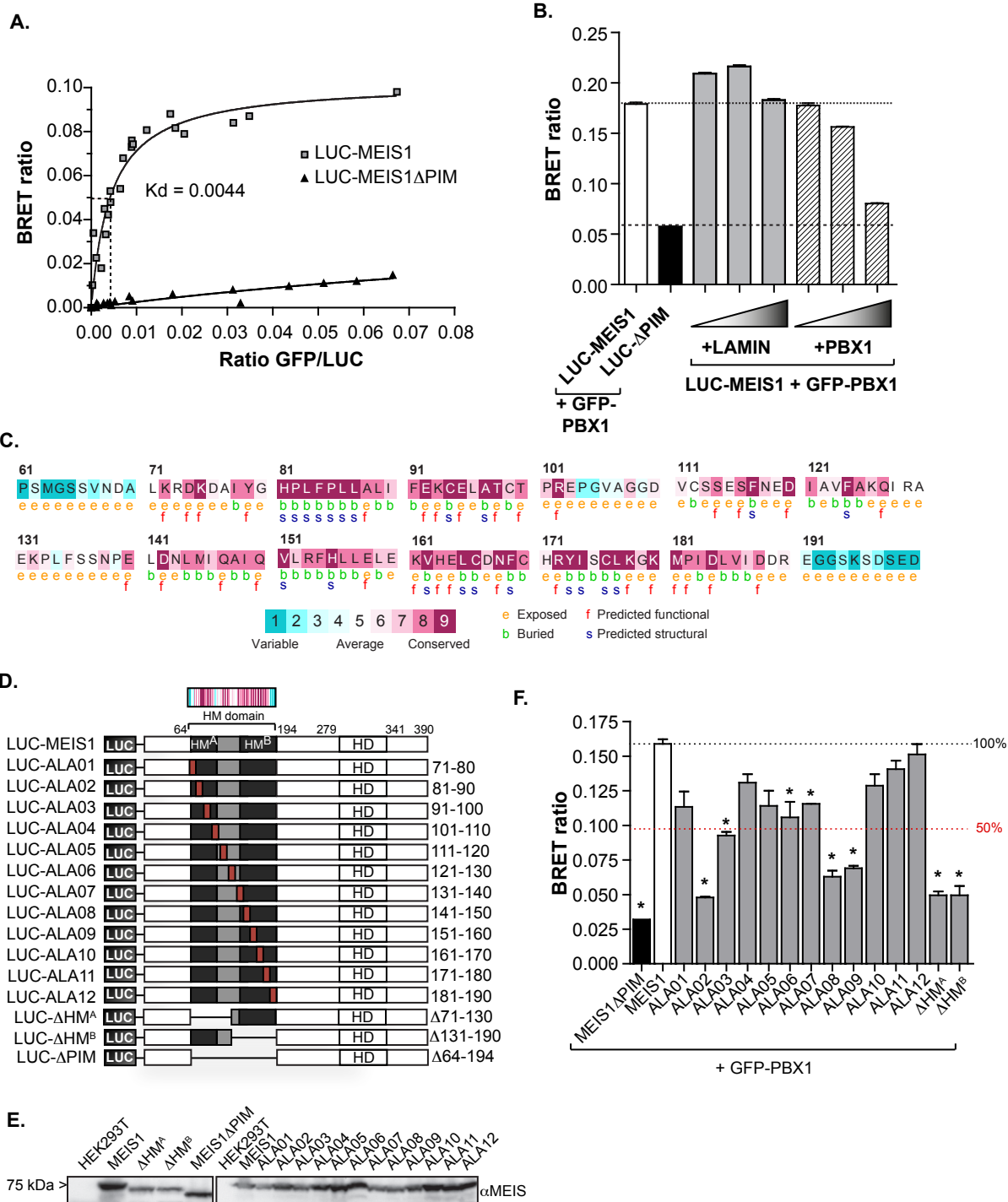


Figure 3.4 Identification of critical residues for MEIS1-PBX1 heterodimerization using the highly specific MEIS-PBX BRET-based assay.

A) LUC-MEIS1 donor-saturation assay showing a hyperbolic increase of BRET signals as GFP-PBX1:LUC-MEIS1 ratio is augmented. Hazardous collisions result in a linear non-specific

BRET signal increase as observed with the LUC-MEIS1 Δ PIM biosensor. Curves represent pool of three experiments. **B)** Bar graph of a BRET competition assay showing the BRET signals when increasing amount (0.5-10 μ g) of untagged competitors LAMIN and PBX1 are co-transfected with constant amount (250 ng) of LUC-MEIS1 and GFP-PBX biosensors. N=2, where only one representative experiment is shown. **C)** Bayesian conservation analysis performed by the Consurf Server⁶² on the MEIS1 HM domain using 123 homologous proteins. Exposed and buried residues were established using the Neural-Network algorithm whereas functional and structural residues were predicted using conservation and accessibility. **D)** Schematic representation the alanine scan MEIS1 mutants of the HM domain. Stretches of 10 amino acids were substituted at a time. **E)** Western blot analysis using total cell protein extracts of HEK293T cells transfected with GFP-PBX1 and the indicated LUC-MEIS1 mutants. Proteins were detected using a MEIS antibody and a TUB α antibody for loading control. **F)** BRET signal and S.E.M. determined for each constructs (n=2) using transfected HEK293T cells with LUC-MEIS1, GFP-PBX1 and the indicated construct.

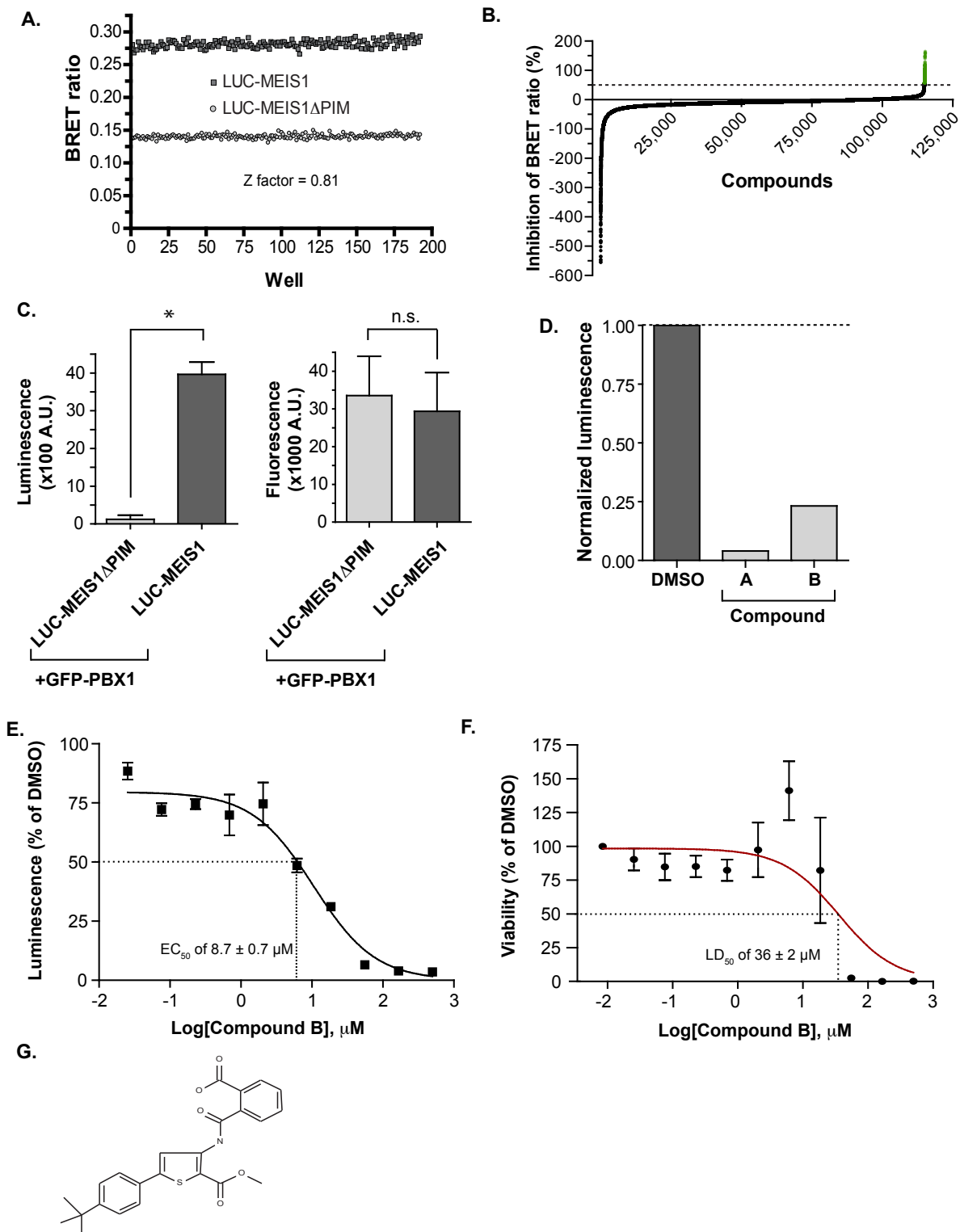


Figure 3.5 High-throughput screen and LUMIER validation assay.

A) BRET signal for each of a 384-well microplate with LUC-MEIS1, or LUC-MEIS1 Δ PIM, and GFP-PBX1 biosensors allowing the calculation of a 0.81 Z-factor. **B)** The BRET signal

inhibition of all the 115K tested compound during the HTS procedure. Compounds inhibiting above 50% of the BRET signal were further tested in a confirmation assay. **C)** Bar graph showing luminescence (left panel) and fluorescence (right panel) counts obtained after the LUMIER assay using protein extracts obtained from HEK293 cells transfected with the indicated control constructs. * P value < 0.05 as determined by Student T-test. **D)** Bar graph from the LUMIER assay showing normalized luminescence output when HEK293 cells were transfected with MEIS1 and PBX1 biosensors and treated with two of the 25 preliminary hits obtained from the HTS. **E)** Dose response curve reporting luminescence counts, normalized to DMSO-treated cells, after a 2-hour treatment with various concentrations of compound B. EC₅₀ was determined using a non-linear regression analysis with a minimum set at 0. Error bars represent S.E.M. and one of two biological replicates is shown. **F)** Dose response curve reporting cell viability, normalized to DMSO-treated cells, upon a 2-hour incubation period with various concentrations of compound B. LD₅₀ was calculated using a non-linear regression analysis with a minimum set at 0. Error bars represent S.E.M. of 2 biological replicates. **G)** Structural formula of the compound B used in the validation experiments.

3.9 Supplementary material

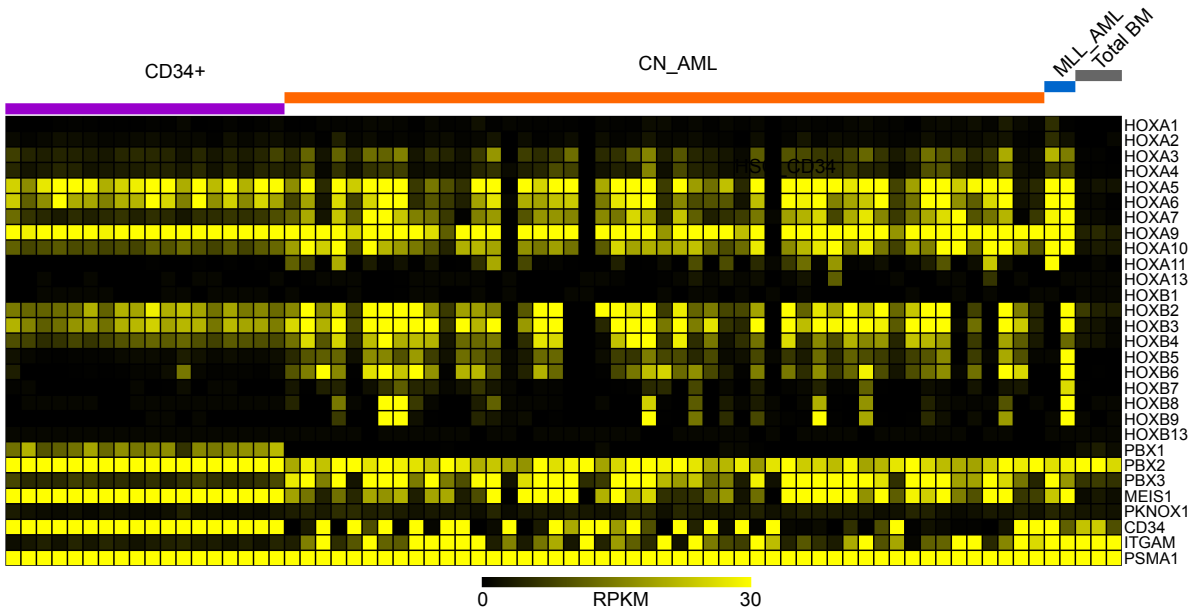


Figure S3.1 HOX gene expression variability within CN-AML cohort.

Heat-map representation of the expression levels of the HOXA and HOXB gene clusters (HOXC and HOXD were not detected) and some of their cofactor genes in every sample included in this study (CD34+, CN-AML, MLL-AML (n=2 represented) and total BM cells). PSMA1 represents an endogenous control.

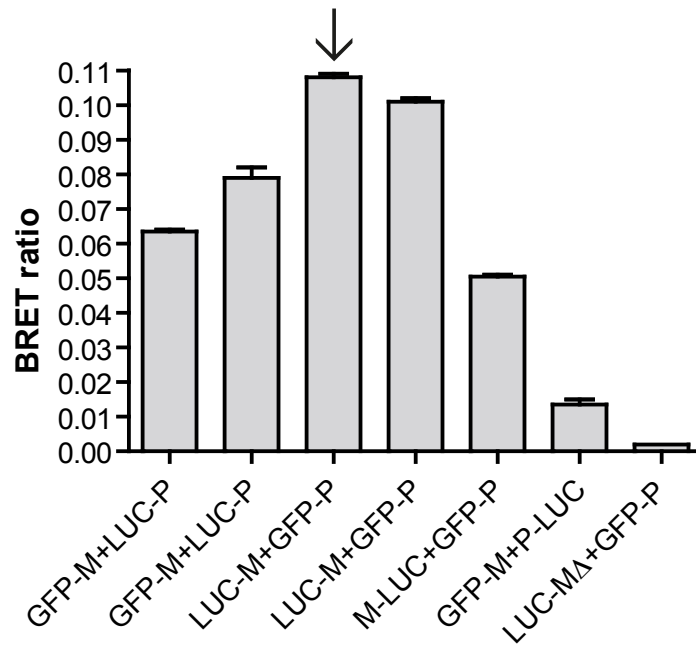


Figure S3.2 LUC and GFP generates higher BRET signal when fused N-terminally to MEIS1 and PBX1, respectively.

A) Bar graph showing the BRET ratio generated by different combinations of MEIS1 and PBX1 biosensors. M = MEIS1; P=PBX1 and their relative position in label reflects N- or C-terminal fusion.

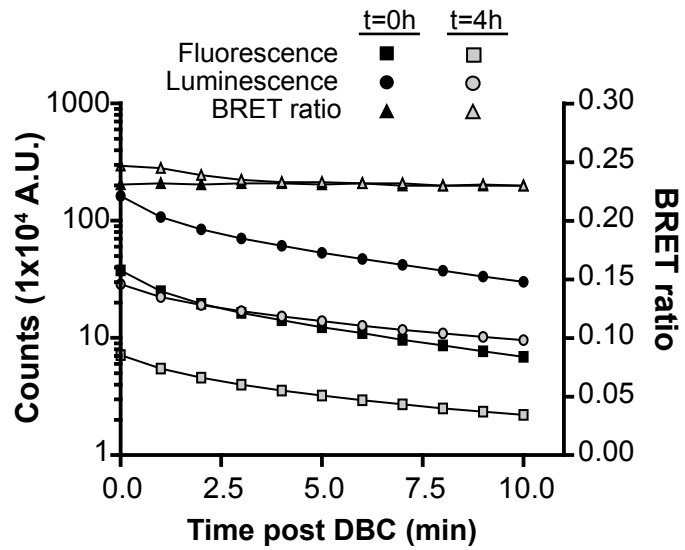


Figure S3.3 BRET ratio is highly stable over time.

Time-course analysis showing fluorescence and luminescence counts (left axis) as well as the BRET signal (right axis) read every minute post-Deep Blue C addition and from cells collected at 2 different time points ($t = 0$ or 4 hours).

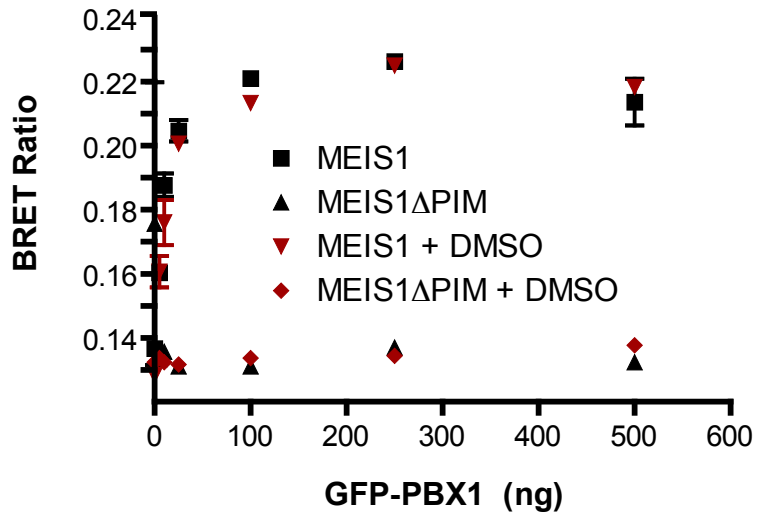


Figure S3.4 DMSO does not affect MEIS1-PBX1 BRET ratio output.

Donor saturation assay indicating that 0.5% DMSO 4-hour treatment on HEK293 cells transfected with 250 ng LUC-MEIS1, or LUC-MEIS1ΔPIM, and indicated amounts of GFP-PBX1 has no effect on the BRET signal.

3.10 Acknowledgements

The authors thank Mélanie Fréchette for her assistance with the animal care and transplantation experiments, Nadine Mayotte and Simon Girard for their excellent technical assistance. We also thank Jean Duchaine, Sébastien Guiral, Pierre Melançon and Anne-Sophie Guenier from the HTS core facility for conducting the BRET HTS. We thank Anne Marinier for sharing her expertise on chemistry and Vincent-Philippe Lavallée for sharing his on survival analysis. We thank Caroline Pabst for sharing results as well as Hugo Lavoie and Martin Audet for BRET training.

3.11 References

1. Argiropoulos B, Humphries R. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*. 2007;26(47):6766-6776.
2. Sanders M, Valk P. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. *Current opinion in hematology*. 2013;20(2):79-85.
3. Dickson G, Liberante F, Kettyle L, et al. HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(8):1216-1225.
4. Li Z, Huang H, Li Y, et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood*. 2012;119(10):2314-2324.
5. Wong P, Iwasaki M, Somervaille T, So C, So C, Cleary M. Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes & development*. 2007;21(21):2762-2774.
6. Ayton P, Cleary M. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & development*. 2003;17(18):2298-2307.
7. Zeisig B, Milne T, García-Cuéllar M-P, et al. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(2):617-628.
8. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg A, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO journal*. 1998;17(13):3714-3725.
9. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(1):224-234.
10. Bürglin T. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic acids research*. 1997;25(21):4173-4180.
11. Chang C, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins N, Copeland N, Cleary M. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(10):5679-5687.
12. Knoepfler P, Calvo K, Chen H, Antonarakis S, Kamps M. Meis1 and pKnox1 bind

DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14553-14558.

13. Berthelsen J, Zappavigna V, Mavilio F, Blasi F. Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *The EMBO journal*. 1998;17(5):1423-1433.

14. Wang G, Pasillas M, Kamps M. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood*. 2005;106(1):254-264.

15. Mamo A, Kros J, Kroon E, et al. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood*. 2006;108(2):622-629.

16. Argiropoulos B, Palmqvist L, Yung E, et al. Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3. *Experimental hematology*. 2008;36(7):845-859.

17. Bisailon R, Wilhelm B, Kros J, Sauvageau G. C-terminal domain of MEIS1 converts PKNOX1 (PREP1) into a HOXA9-collaborating oncoprotein. *Blood*. 2011;118(17):4682-4689.

18. Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood*. 2012;119(2):388-398.

19. Longobardi E, Penkov D, Mateos D, De Florian G, Torres M, Blasi F. Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2013.

20. Abu-Shaar M, Ryoo H, Mann R. Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes & development*. 1999;13(8):935-945.

21. Saleh M, Huang H, Green N, Featherstone M. A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Experimental cell research*. 2000;260(1):105-115.

22. Rieckhof G, Casares F, Ryoo H, Abu-Shaar M, Mann R. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*. 1997;91(2):171-183.

23. Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and

is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes & development*. 1999;13(8):946-953.

24. Dacres H, Wang J, Dumancic M, Trowell S. Experimental determination of the Förster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs. *Analytical chemistry*. 2010;82(1):432-435.

25. Xu Y, Piston D, Johnson C. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(1):151-156.

26. Angers S, Salahpour A, Joly E, et al. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3684-3689.

27. Charest P, Terrillon S, Bouvier M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO reports*. 2005;6(4):334-340.

28. Hamdan F, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *Journal of biomolecular screening*. 2005;10(5):463-475.

29. Abhijit D, Akshi J, Rohit A, Sanjiv SG. Evolution of BRET Biosensors from Live Cell to Tissue-Scale In vivo Imaging. *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4.

30. Simon C, Chagraoui J, Kros J, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes & development*. 2012;26(7):651-656.

31. Macrae T, Sargeant T, Lemieux S, Hébert J, Deneault E, Sauvageau G. RNA-Seq reveals spliceosome and proteasome genes as most consistent transcripts in human cancer cells. *PloS one*. 2013;8(9).

32. Loening A, Fenn T, Wu A, Gambhir S. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2006;19(9):391-400.

33. Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth W, Guy J, Muzyczka N. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *Journal of virology*. 1996;70(7):4646-4654.

34. Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO journal*. 2001;20(3):350-361.
35. Kros J, Beslu N, Mayotte N, Humphries R, Sauvageau G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity*. 2003;18(4):561-571.
36. Barrios-Rodiles M, Brown K, Ozdamar B, et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5715):1621-1625.
37. Haferlach C, Haferlach T. Another piece of the AML puzzle. *Blood*. 2013;122(15):2532-2534.
38. Hollink I, van den Heuvel-Eibrink M, Arentsen-Peters S, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011;118(13):3645-3656.
39. Cancer Genome Atlas Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(22):2059-2074.
40. Breton B, Sauvageau É, Zhou J, Bonin H, Le Gouill C, Bouvier M. Multiplexing of multi-color bioluminescence resonance energy transfer. *Biophysical journal*. 2010;99(12):4037-4046.
41. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*. 2005;106(3):899-902.
42. Debernardi S, Lillington D, Chaplin T, et al. Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events. *Genes, chromosomes & cancer*. 2003;37(2):149-158.
43. Mullighan C, Kennedy A, Zhou X, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia*. 2007;21(9):2000-2009.
44. Vassiliou G, Cooper J, Rad R, et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nature genetics*. 2011;43(5):470-475.

45. Verhaak R, Goudswaard C, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747-3754.
46. Longobardi E, Penkov D, Mateos D, De Florian G, Torres M, Blasi F. Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2014;243(1):59-75.
47. Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary M. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(12):6149-6157.
48. Li Z, Zhang Z, Li Y, et al. PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. *Blood*. 2013;121(8):1422-1431.
49. Beslu N, Kros J, Laurin M, Mayotte N, Humphries K, Sauvageau G. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood*. 2004;104(8):2307-2314.
50. DiMartino J, Selleri L, Traver D, et al. The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood*. 2001;98(3):618-626.
51. Rhee J, Arata A, Selleri L, et al. Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *The American journal of pathology*. 2004;165(4):1343-1350.
52. Sonia C, Jana K, Jalila C, Sylvain M, Humphries RK, Guy S. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1lo hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. 2007;35.
53. Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, et al. New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia*. 2005;19(6):953-964.
54. Li Z, Luo R, Mi S, et al. Consistent deregulation of gene expression between human and murine MLL rearrangement leukemias. *Cancer research*. 2009;69(3):1109-1116.
55. Wang G, Cai L, Pasillas M, Kamps M. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nature cell biology*. 2007;9(7):804-812.
56. Azcoitia V, Aracil M, Martínez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *De-*

developmental biology. 2005;280(2):307-320.

57. Hisa T, Spence S, Rachel R, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *The EMBO journal*. 2004;23(2):450-459.
58. Woolthuis C, Han L, Verkaik-Schakel R, et al. Downregulation of MEIS1 impairs long-term expansion of CD34+ NPM1-mutated acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(4):848-853.
59. Choe S-K, Ladam F, Sagerström C. TALE Factors Poise Promoters for Activation by Hox Proteins. *Developmental cell*. 2014;28(2):203-211.
60. Morgan R, Pirard P, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha H. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer research*. 2007;67(12):5806-5813.
61. Ramsey J, Kettyle L, Sharpe D, et al. Entinostat prevents leukemia maintenance in a collaborating oncogene-dependent model of cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2013;31(7):1434-1445.
62. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research*. 2010;38(Web Server issue):33.

CHAPITRE 4. Mapping the interactome of MEIS1 and PKNOX1 TALE homeoproteins reveals potential functions in mRNA splicing and epigenetic signaling

Bisaillon, R.¹, Bordeleau, M.-E.¹ and Sauvageau, G.^{1,2,3*}

¹Laboratory of Molecular Genetics of Stem Cells, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ²Faculty of Medicine, Montreal, QC, Canada; ³Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada;

***Corresponding author:**

Guy Sauvageau, M.D., Ph.D., Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

4.1 Contribution des co-auteurs

Le chapitre 4 décrit des approches complémentaires de protéomique visant à identifier de nouveaux partenaires de MEIS1 et PREP1. Une attention particulière est portée sur les domaines C-terminaux, impliqués différemment dans la leucémogénèse tel que présenté au Chapitre 2.

RB: Design expérimental, réalisation des expériences, analyse des données, rédaction du manuscrit.

MEB: Design expérimental (Figure 5), réalisation des expériences (20% Figure 5)

GS: Design expérimental, supervision de la rédaction

Les travaux rapportés dans ce chapitre représentent un projet en cours.

4.2 Résumé

Les homéoprotéines HOX and leurs co-régulateurs MEIS/PKNOX1 et PBX sont des joueurs importants des leucémies humaines. Une expression élevée de HOX/MEIS/PBX est associée à un nombre croissant de mutations leucémiques et leur expression ectopique semble suffisante et essentielle à la transformation cellulaire dans plusieurs modèles murins. MEIS1 et PKNOX1 sont tous deux membres de la famille MEIS des homéoprotéines TALE mais divergent dans leur capacité à accélérer les leucémies *Hox*. Malgré que certaines études aient confirmé l'activité transcriptionnelle de ces homéoprotéines, le mécanisme moléculaire précis qui mène au développement leucémique reste encore imprécis. Ici nous décrivons deux approches protéomiques complémentaires visant à identifier de nouveaux partenaires d'interaction de MEIS1 et de PKNOX1: 1) Un criblage par double-hybride de levures en utilisant les domaines C-terminaux de MEIS1 et PKNOX1 en guise de proies; et 2) une purification de complexes protéiques par affinité couplée à une détection par spectrométrie de masse. La détection des membres PBX de même que CREB1 a confirmé l'efficacité de nos méthodologies expérimentales. Nos résultats indiquent que MEIS1 et PKNOX1 interagissent avec un large groupe de partenaires communs impliqués notamment dans l'épissage de l'ARNm, la réparation et répllication de l'ADN de même que dans la modification de la chromatine. Des expériences préliminaires de co-immunoprécipitations confirment l'association physique de MEIS1 avec PDS5A et TDG. Ensemble, notre étude supporte un rôle pour les protéines TALE dans des voies cellulaires importantes pour l'hématopoïèse normale et leucémique.

4.3 Summary

The HOX homeoproteins along with the MEIS/PKNOX1 and PBX coregulators are indisputable players in human leukemia. High expression level of HOX/MEIS/PBX is associated with an increasing number of leukemia-related mutations and their enforced upregulation has been shown to be sufficient and essential for cellular transformation in multiple mouse models. MEIS1 and PKNOX1 are members of the same MEIS family of TALE homeoproteins but differ in their ability to accelerate HOX-induced leukemogenesis. Although biochemical studies have confirmed the transcriptional function of these homeoproteins, the exact molecular mechanism that leads to leukemia development is still elusive. Here we described two complementary proteomic approaches aimed at identifying new proteins interacting with MEIS1 and PKNOX1: 1) A yeast-two-hybrid screen with MEIS1 and PKNOX1 C-terminal domains acting as baits; and 2) an affinity-based protein complex purification coupled to mass spectrometry. The detection of PBX proteins as well as CREB1 confirmed the effectiveness of our experimental design. Our results indicate that MEIS1 and PKNOX1 share a large subset of candidate partners that are involved in pre-mRNA splicing, DNA repair and replication as well as chromatin modification. Preliminary co-immunoprecipitation experiments also confirmed the interaction between MEIS1 and PDS5A as well as with TDG. Overall our study supports a role for TALE proteins in cellular pathways critical for normal hematopoiesis and leukemia development.

4.4 Introduction

MEIS/PKNOX and PBX TALE homeoproteins have been extensively associated with leukemia development. The TALE family is characterized by an atypical DNA-binding homeodomain containing a Three Amino acid Loop Extension (TALE) located between the first and second α helix.¹ The TALE PBC family includes the founding member PBX1 that was originally identified as a recurrently translocated gene fused to bHLH transcription factor E2A in pre-B cell lymphoblastic leukemias.² The MEIS1 gene was identified in the spontaneously leukemic BXH-2 mouse strain as a recurrent retroviral integration site, along with *HOXA9* and *HOXA7* homeobox genes, leading to abnormal gene expression.^{3,4} We and others have since shown that MEIS1 and HOX synergize to induce leukemia development, a feature requiring a physical association of MEIS1 to PBX.⁵⁻⁹ Furthermore a subgroup of MLL-translocations relies on expression of MEIS1 and HOXA7/9 to achieve cellular transformation.^{9,10} This HOX/MEIS/PBX gene signature has since become a hallmark of several leukemia subtypes with a broad mutation spectrum and has been successfully used as prognostic markers, confirming its relevance in human leukemogenesis.¹¹⁻¹³

MEIS/PKNOX and PBX families can heterodimerize with each other as well as with the HOX protein family (reviewed in ¹⁴). The MEIS/PKNOX-PBX heterodimer formation stabilizes both subunits, exposes the PBX nuclear localisation signals and triggers the nuclear translocation of the complex.¹⁵ PBX nuclear localization further depends on the sustained interaction with MEIS, which masks the PBX nuclear export signals, or requires a PKA-dependent phosphorylation event which likely induces a conformational change favouring nuclear retention.^{16,17} The TALE-HOX interaction is DNA-dependent and increases HOX DNA binding affinity and specificity. Because the TALE-TALE and TALE-HOX protein-protein interaction (PPI) are mediated with distinct binding domains, HOX-TALE-TALE heterotrimers can also form on DNA bound sites and maximise transcriptional output.^{18,19}

Despite being linked to leukemia development since the mid 90's, very little is known about the exact mechanism of action of MEIS1. The reported PPIs involving the TALE proteins mostly consist of transcription factors. POU2F1, CRTIC1/2, STAT5, PDX1, ETS1, YAP1, SMAD2/3/4, CEBPA/B, TFAP4, PAX6 and other homeoproteins were all reported to associate with one, or a combination, of MEIS1, PBX and PKNOX1.²⁰⁻³⁰ A second category of interactors includes chromatin modifiers such as CREBBP, class I HDACs along with the NCOR2 and SIN3B corepres-

sors, which dynamically bind to HOX-PBX in a PKA-dependent manner.^{16,17} MEIS1 can contact the SWI/SNF family member ARID1A whereas proteomic experiments performed on PKNOX1 revealed MYH9, RPS3, EIF4E2 as well as P160 (also interacting with MEIS1¹⁴) as potential binding partners.³¹⁻³³ Finally the PBX cellular distribution, in addition to MEIS1- and PKNOX1-induced nuclear translocation, is also determined by the interaction with MYH10 and XPO1 in a PKA-dependent manner.^{17,34} These results provide comprehensive information regarding cluster assembly of tissue-specific transcription factors as well as the biochemistry regulating the TALE cellular distribution. Unfortunately the disease-linked functions remain elusive.

We and others have shown using structure-to-function studies that 3 MEIS1 domains were required for the acceleration of HOXA9-induced AML development, namely the Homothorax-MEIS domain (HM), the DNA-binding homeodomain (HD) and the C-terminal domain (CTD).⁶⁻⁸ PKNOX1 exhibits high sequence homology to MEIS1 regarding the former 2 domains, but shows no sequence conservation over the C-terminal domain.⁵ Thus MEIS1 and PKNOX1 share the ability to interact with PBX and HOX protein, but as opposed to MEIS1, PKNOX1 fails to accelerate HOX-induced leukemias, suggesting a critical role played by the MEIS1 CTD in leukemogenesis. Furthermore PKNOX1 gene inactivation spontaneously leads to lymphoma and ovarian carcinoma development, suggesting tumour suppressor functions.^{5,35} We recently demonstrated that the addition of the MEIS1 C-terminal domain onto PKNOX1 (PKNOX1-MC) recapitulated MEIS1 function in the acceleration of HOXA9-induced leukemia development,³⁶ suggesting a recruitment of critical mediators through MEIS1 CTD.

We hypothesized that MEIS1 and PKNOX1 achieved high functional specificity through differential recruitment of protein partners at their respective C-terminus and performed parallel proteomic studies on these 2 TALE proteins. We set to identify new proteins interacting specifically with their C-terminal domain by screening a cDNA library derived from hematopoietic progenitor cells using the yeast-two-hybrid technique. Alternatively we also performed an unbiased affinity-based protein complex purification coupled to mass spectrometry to generate a MEIS1 and PKNOX1 interactome dataset. Preliminary analysis revealed a great overlap between MEIS1 and PKNOX1 interacting candidates, which surprisingly included very few transcription factors or proteins from the RNA transcription machinery. Instead we found proteins involved in the RNA splicing, DNA methylation and histone modification processes as well

as proteins from the cohesin complex. Altogether, and upon validation of the common and exclusive MEIS1 and PKNOX1 potential partners, these results will provide critical information relative to the TALE functions in normal hematopoietic cells and shall expand our knowledge on the mechanism of leukemia development.

4.5 Material and methods

Yeast-Two-Hybrid screen

A yeast two-hybrid screen was performed according to the manufacturer's protocol (Clontech) using the C-terminal domain of MEIS1 (M334-M390) and PKNOX1 (C326-Q436) as baits to screen a cDNA library generated from murine c-Kit⁺Lin⁻ hematopoietic progenitor cells. The yeast strain Y187 (baits) were mated with the AH109 (library) and plated on selective media (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/+3-amino-1,2,4-triazole). Positive colonies were picked, DNA was extracted and transformed in bacteria. Plasmidic DNA was extracted and sent to sequencing. cDNA clones that interacted with LAMIN or Large T antigen were discarded.

Large-scale purification of TALE-containing protein complexes

PA-PC-MEIS1, PA-PC-PKNOX1, PA-PC-PKNOX1-MC cloned in pcDNA3 were transfected in HEK293 cells maintained in 10% FBS DMEM using Lipofectamine according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Stable cell lines were generated upon selection with 1 mg/mL G418. Selected clones were expanded up to 40x15-cm dishes and collected cells were lysed in buffer A (25 mM Hepes pH 7.0, 25 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% NP-40) for 30 min. at 4°C. Lysates were then centrifuged at 850xg for 3 min., pellets were resuspended in buffer B (50mM Hepes pH 7.6, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.3M ammonium sulfate) and incubated with rotation for 30 min. at 4°C. Upon centrifugation of lysates at 400,000 xg for 12 min., the supernatants were dialysed against buffer C (50mM Hepes 7.6, 300mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol). The extracts were then mixed with anti-Protein C affinity matrix (Roche) pre-washed 3x with Prot. C buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.1% NP-40). Upon addition of 2 mM CaCl₂, the extracts were incubated for 5 hours at 4°C with rotation. Beads were washed 3x with Prot.C washing buffer (50 mM NH₄HCO₃, 75 mM NaCl and 1 mM CaCl₂). The proteins were eluted with Prot.C elution buffer (50 mM NH₄HCO₃, 15 mM EGTA, 5 mM EDTA) 3x 30 min. and analysed by mass spectrometry.

Mass spectrometry analysis

Samples were processed as described.³⁷

Co-Immunoprecipitation and western blotting

Cyto-nucleoplasmic protein extracts were prepared using CSK buffer as described.³⁸ Primary antibodies used in this study include MEIS,⁶ MYC (Millipore), HA (Boehringer Ingelheim), GST (Thermo Scientific), PKNOX1 (Abcam), PDS5A (Bethyl Laboratories) and FLAG (Sigma). Secondary anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories. For immunoprecipitation, typically 300-600 μ g of protein extract were incubated overnight at 4°C with 1 μ g of primary antibody and 25 μ L of coated agarose beads (Santa Cruz) before undergoing 4 washes with extract buffer.

4.6 Results

Engineering and testing of the TALE C-terminal baits

The fusion of the C-terminal domain (CTD) of MEIS1 converted the tumour suppressor PKNOX1 into a pro-leukemia factor. In an attempt to identify potential mediators of MEIS1 function, we setup to find proteins capable of binding MEIS1 and PKNOX1 respective CTDs using the Yeast-Two-Hybrid (Y2H) technique.³⁹ The C-terminal baits were cloned downstream of the GAL4 DNA-binding domain (DBD) and the MYC epitope (Fig. 4.1A). The expression and size of the bait constructs was confirmed in extracts from transfected AH109 and Y187 yeast strains using western blotting with an anti-MYC antibody (Fig. 4.1B; 7 kDa and 12 kDa for MEIS1 and PKNOX1 CTD, respectively, 17 kDa for GAL4 DBD). Every constructs used in these experiments expressed the appropriate selection marker gene as assessed by yeast colony growth and minimal SD media (Supplementary Fig. 4.1; CTD baits, LAMIN and TP53: *TRP1*; Large T antigen: *LEU2*). Adding to the plasmid selection markers, a physical interaction between the GAL4 DBD and activation domain (AD) further drives the transcription of two supplementary nutritional markers, HIS3 and ADE2 (Fig. 4.1C, right panel: TP53 and Large T antigen positive control colony growth on minimal media lacking HIS). The autonomous activation of nutritional reporter genes observed when the C-terminal baits were mixed with empty AD control could be eliminated by the addition of 2.5 mM of HIS competitor 3-AT (Fig. 4.1C; left and middle panels). All these results indicated that our engineered constructs were correctly expressed and provided the proper selective tools that would allow us to screen for potential interactors.

Screening a cDNA library derived from the progenitor-enriched Lin^{Kit}⁺ cell population

The bait-induced autonomous activation of nutritional reporter genes was then tested with the cDNA library that was generated from Lin^{Kit}⁺ hematopoietic cells (Fig. 4.2A). Whereas background colonies were detectable with both CTD baits in the absence of 3-AT, addition of 2.5 mM and 5 mM 3-AT was sufficient to remove most of the non-specific colony growth induced by PKNOX1 CTD and MEIS1 CTD, respectively (Fig. 4.2A; middle and bottom rows). A large-scale screen was then performed using each CTD as bait and positive yeast clones were selected on minimal SD media lacking TRP/LEU/ADE/HIS amino acids supplemented with 3-AT HIS competitor. In total 1.4×10^5 and 6×10^5 clones were tested against the MCT and PCT bait, respectively, which yielded ~3600 and 93 colonies for MCT and PCT, respectively (Fig. 4.2B). To

reduce the number of MCT positive clones, and potentially eliminate most of the false positive, the biggest colonies were restreaked onto minimal SD media supplemented with 200 mM 3-AT (Fig. 4.2C). Of the 1400 selected large colonies 121 grew back, a resistance observed with none of the smaller colonies tested (data not shown), and potentially indicative of a strong physical interaction.

Genetic and molecular validation of the preliminary MEIS1 and PKNOX1 candidates

The remaining positive clones were sequenced and in-frame cDNAs (Fig. 4.3A) were subjected to functional genetic validation using the CTD baits and GAL4 DBD control. Most of the tested clones (63% PCT and 74% MCT) resulted in colony formation on minimal selection media when mated with their respective CTD but not with control GAL4 DBD, suggesting that activation of reporter nutritional genes was not a result of non-specific activity from the cDNA moiety (Fig. 4.3B). Notably, the MEIS1 CTD candidate dataset included CREB1, a known interactor of MEIS1 C-terminal domain, and confirmed that our experimental approach was relatively sound (Fig. 4.3C).^{23,25} None of the potential partners of the PKNOX1 CTD has been reported in the literature but it is interesting to note that 4/13 hits (WWP2, PSMA7, UBE2E1 and UBR4) are related to ubiquitination and proteasomal degradation.

We next sought to determine if any of the candidates were capable of binding the C-terminal baits in mammalian cells. A subset of the cDNAs were cloned into pcDNA3 in-frame with an HA epitope and transiently transfected in HEK293 cells. The MEIS1 candidates M22, M26, M36, M93, M99 and M119 as well as the PKNOX1 candidates P01, P05, P24, P43, P66 and P90 were detected on HA-immunoblots (Fig. 4.4A). Furthermore, the M26 clone, which encompasses the Uracil-DNA glycosylase-like domain of TDG, was efficiently pulled-down by Glutathione Sepharose beads when co-expressed with GST-MCT, but not with GST alone, in cyto-nucleoplasmic extract (Fig. 4.4B).

Engineering of affinity purification constructs

In parallel we sought to identify additional partners using an affinity-based protein purification approach coupled to mass spectrometry. To this end MEIS, PKNOX1, PKNOX1-MC (a PKNOX1 mutant that partly recapitulates MEIS1 function in leukemia development)³⁶ and GFP control were N-terminally fused to Protein A and Protein C epitopes (from here on, PAPC) (Fig. 4.5A). All the engineered constructs were expressed at the expected size (Fig. 4.5B) and were

transfected in HEK293 cells to generate stable cell lines. The clones expressing the correct construct were selected (Fig. 4.5C; asterisk) and further subcellular fractionation analysis revealed that most of the constructs were detectable in both the cytoplasmic and nuclear fractions (Fig. 4.5D; C: cytoplasmic; N: Nuclear; cn: cyto-nucleoplasmic). Of note, this last experiment suggested that the PKNOX1 antibody likely recognized the Protein A epitope.

Large scale Protein C-based complex purification successfully enriched for tagged-homeo-proteins

A single affinity purification step (Protein C) was performed on cytosolic and nuclear extracts obtained from 1×10^9 HEK293 cells with the objective to detect weaker and more transient PPIs. Aliquots from each step of the first purification, as analysed by western blot, confirmed that, despite some loss in the purification process, enough material was purified in the elution fraction to undergo mass spectrometry analysis (Fig. 4.6A). A second large-scale purification worked sufficiently well to analyse the elution product from PKNOX1-MC and GFP nuclear fractions (data not shown). This second PKNOX1-MC dataset has been combined to the first PKNOX1-MC dataset.

Enrichment in proteins involved in RNA splicing and DNA-related processes

The proteins identified with at least 90% confidence in either the cytoplasmic or nuclear fractions of the PAPC-GFP control were considered as contaminants and removed from the TALE datasets. Any remaining protein identified with 100% confidence and at least one peptide was considered a candidate. Furthermore to facilitate the analysis, cytoplasmic and nuclear candidates were pooled to form one dataset per TALE protein. The most prominent proteins detected in the elution fractions are the well characterized MEIS- and PKNOX-interacting PBX proteins, confirming that the experimental conditions are sound (see Table 4.1 for listing of all exclusive and shared datasets). In support of this PSMA7 interacted with PKNOX1 in both the Y2H and the affinity purification approaches (Fig. 4.3 and Table 4.1).

Comparison of MEIS1 and PKNOX1 datasets revealed that the majority of the MEIS1-binding proteins also interact with PKNOX1 (81%), whereas slightly less than half (43%) of the PKNOX1 dataset was shared with the MEIS1 dataset (Fig. 4.6B and Table 4.1). This result suggests that MEIS1 and PKNOX1 have evolved to contact a distinct set of protein partners while maintaining the ability to interact with a large common set of proteins, perhaps through

heterodimerization with PBX. A functional annotation analysis was performed on the 78 candidates shared by the MEIS1 and PKNOX1 using the GO term enrichment (Biological Process) application from DAVID Bioinformatics (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Four clusters were significantly over-represented and included, in order of significance, RNA splicing, DNA metabolic processes (repair, replication), chromatin organization and M phase of the cell cycle (Fig. 4.6C; detailed list of GO terms in Supplementary Table 4.1).

To validate the mass spectrometry results, co-immunoprecipitation experiments were performed using transiently transfected HEK293 cells. PDS5A, a critical regulator of the cohesin complex,⁴⁰ was recently identified as a new MLL-translocation partner in an AML patient,⁴¹ and was abundantly detected in every dataset. The endogenous PDS5A was detected in HEK293 transfected with various constructs, including PAPC-MEIS1, FLAG-PKNOX1, HA-PBX1 as well as FLAG-GFP and FLAG-RUNX1 controls (Fig. 4.6D; left panel). PAPC-MEIS1, FLAG-RUNX1 and FLAG-PKNOX1 were also detected using an anti-FLAG antibody (Fig. 4.6D; middle panel). Endogenous PDS5A was efficiently precipitated by an anti-FLAG, anti-Protein C and anti-PDS5A in cell extracts containing FLAG-RUNX1, PAPC-MEIS1 and FLAG-GFP, respectively, but not by an anti-HA or isotypic antibody in cell extracts containing HA-PBX1 and FLAG-PKNOX1, respectively (Fig. 4.6D; right panel). The chromatin-bound lysis buffer contains DNaseI, ruling out the possibility that PDS5A was non-specifically precipitated through fragment of DNA contaminants. Additional experiments are necessary to confirm these interactions and are currently ongoing. The PAPC-PKNOX1-MC was included to facilitate the identification of proteins specifically interacting with the C-terminal domain of MEIS1. The PKNOX1-MC dataset included proteins detected in one of the two purifications (16% overlap). Interestingly 14 candidates are shared between MEIS1 and PKNOX1-MC but excluded from PKNOX1, suggesting that these partners likely bind to the C-terminal domain of MEIS1 (Table 4.1). The most prominent interactor is CCAR2, a protein predicted to bridge the cohesin complex with RNA splicing.^{42,43} More on this topic is discussed below.

4.7 Discussion

To shed light on the mechanism of action of MEIS1 and PKNOX1 in cancer development we exploited two complementary approaches, a yeast-two-hybrid genetic screen and an affinity-based protein purification in mammalian cells, and identified novel interacting candidates involved in restricted and intertwined cellular processes. The detection of the PBX protein family validated the efficacy of the affinity-purification conditions. Furthermore PSMA7, a 20s proteasome subunit, was identified as a specific PKNOX1 interactor with both systems. This result suggests that this PPI is genuine and is concordant with previous studies linking TALE protein stability and proteasomal degradation.^{44,45}

A functional clustering analysis revealed that MEIS1 and PKNOX1 bind proteins involved in pre-mRNA splicing, DNA repair and replication as well as chromatin organization. The interest of these particular processes is twofold: First, they are all interconnected through the concerted action of specific “multi-tasking” protein complexes such as the cohesin complex, the DNA methylation machinery and histone modifying enzymes.⁴⁶⁻⁴⁸ Secondly recent deep sequencing studies revealed that critical components of these biological processes are recurrently mutated in AML patients, strongly suggesting that TALE proteins are participating in strategic pathways involved in cancer development.^{49,50} Here we discuss the potential roles played by homeoproteins in the aforementioned processes and expand on some of the common and distinct candidates detected between MEIS1 and PKNOX1 datasets.

Cohesin complex

The mammalian ring-like cohesin complex (SMC1, SMC3, RAD21 and STAG) functions by embracing *cis* or *trans* DNA molecules, an activity required for numerous cellular processes such as DNA replication and repair, sister chromatids cohesion as well as gene transcription. We identified two core members of the cohesin complex (SMC1, SMC3) along with the accessory cofactor PDS5A, which is essential for maintenance of sister chromatids cohesion during the S/G2 phases of the cell cycle. Deregulation and mutations of cohesin factors have been associated with cancer development and developmental diseases (cohesinopathies) through cellular defects independent of sister chromatids cohesion (reviewed in ⁵¹), an observation coherent with the normal karyotype detected in AML patients.⁵⁰ Instead it appears that the transcriptional function of the cohesins is accountable for some of these pathologies, perhaps by maintaining aberrant levels of master regulator genes such as RUNX, the HOXA gene cluster or even MYC.⁵²⁻⁵⁴

One possible mechanism of cohesin-mediated gene regulation involves stabilization of long-range chromatin loopings that bring *cis* DNA elements (enhancers, promoters) in close proximity, a function facilitated by the insulator protein CTCF and/or by the Mediator complex and tissue-specific transcription factors.⁵⁵⁻⁵⁷ The latter is supported by a recent study showing that the CTCF-independent binding sites of the cohesin complex partially overlapped those of tissue-specific transcription factors, including PKNOX1.⁵⁵ This tissue-specific binding would provide a dynamic way to facilitate expression of genes involved in cell specification. Alternatively, yet also compatibly, the cohesin complex could modulate transcription by recruiting histone modifiers (or vice versa) and trigger nucleosomal changes at local DNA loci. In this regard SMARCA5, a member of the chromatin remodelling SWI/SNF family, was found in a distinct protein complex containing the core cohesin factors as well as members of the NuRD complex, mostly known for its function in methylated DNA-dependent recruitment of histone deacetylases (more on this below).⁵⁸ Of interest SMARCA5 is one of the most abundant proteins detected in our purification dataset after PBX and is often overexpressed in human AML, thereby strengthening its potential function as a leukemogenic mediator.⁵⁹

Additionally we purified ACTL6A (BAF53A), a member of the Brg/Brm-Associated Factor (BAF) chromatin remodelling family. This association is particularly interesting because we recently reported an interaction between MEIS1 and another BAF subunit, ARID1A, along with its functional requirement during hematopoiesis.³³ Importantly ACTL6A is a known partner of ARID1A and is also essential for hematopoiesis, which further supports a role for TALE homeoproteins in critical recruitment of chromatin modifiers during normal hematopoiesis and leukemia.⁶⁰

Pre-mRNA splicing

The cohesin complex can also modulate transcription, along with CTCF, by blocking RNA pol. II progression.⁶¹ Interestingly this activity also facilitates inclusion of weak exons in spliced mRNA and, of note for discussion below, is inhibited by the presence of DNA methylation.⁶² SRRM1 is an accessory splicing protein that associates with the cohesin complex as well as with the spliceosomal U2 subunits SF3A3, SF3B5, DNAJC8 and DDX42.⁶³ Along these lines CCAR2, also a cohesin interactor,⁴³ has been reported to bridge messenger ribonucleoprotein particles with RNA pol. II and to negatively regulate exon inclusion.⁴² The pull-down of SRRM1 by MEIS1 and PKNOX1 and of CCAR2 by MEIS1 and PKNOX1-MC supports a role

for these tissue-specific transcription factors in the coordination/synchronization of alternative pre-mRNA splicing from epigenetic cues. This function would be concordant with the critical role played by the spliceosome in leukemia development.⁶⁴

DNA methylation

In addition to the cohesin-SMARCA5-NuRD PPI described above, both TALE proteins immunoprecipitated MTA2, a core subunit of the NuRD complex. Furthermore MEIS1 and PKNOX1-MC specifically bound the Methyl DNA-binding domain protein 3, MBD3, a variable subunit of the NuRD complex.^{65,66} Together these findings support two separate studies that identified PKNOX1 and PBX1 as well as MEIS1, PBX1 and HOXB8 as tissue-specific methyl DNA-interacting proteins.^{67,68} The activity of MBD3, which has recently received much attention for its role in iPSC generation,⁶⁹ is elusive based on conflicting studies reporting the inability of MBD3 to actually bind methylated CpG.^{65,70} An explanation would be that MBD3 has evolved to engage methylated DNA through tethering of specific 5-methylcytosine readers such as, perhaps, homeoproteins like MEIS1, PKNOX1, or POU5F1.⁷¹

Intriguingly the Y2H candidate TDG (Thymine-DNA Glycosylase) also appears to bind to the CTD of MEIS1. TDG recognizes 5-carboxylcytosine and 5-formylcytosine generated by TET-driven oxidation of 5-methylcytosine and proceeds to restore the unmodified cytosine through the Base Excision Repair (BER) pathway.⁷² Altogether it appears that MEIS1, PKNOX1 and PBX1 can all be recruited to methylated DNA loci via the NuRD complex while only MEIS1 seems able to engage intermediate stages of the DNA demethylation pathway through recruitment of/by TDG.

GENOMIC LOCATION

As mentioned above PDS5A is a novel MLL fusion gene in AML.⁴¹ MLL has a CxxC domain which specifically binds to non-methylated CpG islands.⁶⁸ The association with PDS5A might therefore promote aberrant cohesin-dependent structures at key MLL target genes. This genomic localization concept also applies to MEIS1 and PKNOX1. Indeed although the majority of the interactors are shared, the genomic binding sites of MEIS1 and PKNOX1 mostly diverge, MEIS1 being enriched at intra- and intergenic regions and PKNOX1 at promoters.^{25,73} It will therefore be important to address the function of these PPIs in the context of different genomic binding sites. For example methylated CpG islands located near transcription start sites repre-

sent an epigenetic sign of repressive chromatin, whereas when located within the gene body, it can both facilitate or impede transcript elongation (reviewed in ⁷⁴).

Altogether our data suggest a functional role for MEIS1 and PKNOX1 in a subset of intertwined cellular pathways that regulate normal hematopoiesis and leukemia development. Importantly the detected candidates could explain both the activating (SWI/SNF) and repressive (NuRD) activity of MEIS1 in transcriptional regulation.^{24,75} Upon confirmation of a subset of the PPIs, careful validation experiments using loss- and gain-of-function in mouse models and primary AML cells shall decipher key molecular events involved in leukemogenesis and potentially provide new therapeutic targets.

4.8 Tableau

Tableau 4.1 Candidates interacting with TALE proteins identified by mass spectrometry

Table 4.1. Candidates interacting with TALE proteins identified by mass spectrometry

MEIS1/PKNOX1/PKNOX1-MC					MEIS1/PKNOX1			MEIS1/PKNOX1-MC			
Symbol	T.U.P.				Symbol	T.U.P.		Symbol	T.U.P.		
	M	P	MC.1	MC.2		M	P		M	MC.1	MC.2
MEIS1	17	1	2	2	OAT	4	6	WTAP	2	0	2
PBX1	17	23	25	0	ACAT1	2	5	MKI67	2	0	1
PBX2	16	25	25	12	PPIH	2	2	TCERG1	2	0	1
TOP2A	11	5	4	7	CCDC86	2	2	CCAR2	1	3	5
PBX3	10	17	18	19	FLNB	2	1	PSMD11	1	2	0
ACTN4	8	12	2	5	GLUD1	1	4	CTTN	1	2	0
SMARCA5	8	10	9	0	CALML5	1	2	PRP6	1	2	0
DNAJC10	7	5	8	5	DSP	1	8	CD2BP2	1	1	1
MDC1	5	7	1	2	PPIB	1	7	MBD3	1	2	0
ACTL6A	4	6	3	0	DSG1	1	5	DMBT1	1	0	1
PDS5A	4	2	3	4	JUP	1	3	EXOSC7	1	0	1
RAD50	4	1	1	1	DNAJC14	1	3	GAR1	1	0	1
SRRM1	4	4	1	0	DNMT1	1	2	RPRD1B	1	0	2
DDX42	3	4	1	0	ECHS1	1	2	EXOSC1	1	0	1
SF3A3	3	5	4	3	TFAM	1	2				
APEX1	2	1	2	0	TIMM44	1	2				
BAZ1B	2	1	1	0	RFC2	1	2				
CPSF1	2	2	1	2	EIF2AK2	1	1				
EXOSC6	2	2	1	2	CKAP2	1	1				
FEN1	2	4	1	0	FLG2	1	1				
IK	2	1	1	0	PPIF	1	1				
LDHA	2	5	2	0	ENSA	1	1				
MTA2	2	2	1	0							
NUMA1	2	5	0	2							
SF3B5	2	1	1	1							
SMARCB1	2	1	1	1							
SMC1A	2	2	0	3							
SMC3	2	4	1	1							
SMU1	2	3	2	1							
SNRPB2	2	2	1	1							
TOP2B	2	3	4	0							
BCAS2	1	1	1	0							
BRD3	1	1	0	1							
CSTF3	1	2	0	1							
CTCF	1	1	0	1							
DNAJC8	1	1	1	0							
EXOSC9	1	1	0	1							
FUBP1	1	4	1	2							
HMGA1	1	1	0	1							
MRE11A	1	3	1	2							
POLDIP3	1	1	1	0							
PRPF4	1	2	1	0							
PRPF40A	1	1	1	0							
PSME3	1	1	2	2							
PSPC1	1	1	3	0							
SBSN	1	2	1	0							
SEPT7	1	2	3	1							
SKIV2L2	1	1	1	0							
SMARCD2	1	2	0	1							
SYMPK	1	1	1	0							
THOC6	1	2	1	1							
TMEM109	1	1	1	1							
TROVE2	1	1	1	0							
UHRF1	1	3	0	2							
WDR57	1	2	1	0							
ZFR	1	1	0	3							

PKNOX1/PKNOX1-MC			
Symbol	T.U.P.		
	P	MC.1	MC.2
LRPPRC	8	0	1
LCN1	5	2	1
MCM7	3	2	2
PSMD2	3	2	1
ACAT2	3	1	0
MCM5	2	5	0
DDX23	2	3	0
CWC15	2	1	0
SMCHD1	2	2	1
HDLBP	2	2	0
CDC5L	2	1	0
HEXIM1	2	1	0
VAT1	2	1	2
GCN1L1	2	1	0
SEC24B	2	1	0
SCP2	2	1	0
HCFC1	2	0	0
NKRF	2	0	1
THOC2	2	0	1
USP39	2	0	1
ACTR1A	1	1	0
POLR2C	1	1	2
RNH1	1	2	0
ARPC3	1	1	0
GNAS	1	1	0
API5	1	1	0
PSMD1	1	1	0
GIGYF2	1	1	0
PSMD6	1	1	0
DCTPP1	1	1	0
FAM98B	1	0	2

MEIS1		
Symbol	T.U.P.	
	M	P
MAB21L1	1	
SPRR2A	1	
LTF	1	
RANBP9	1	

*T.U.P. Total Unique Peptide
 **Darker color corresponds to higher number of T.U.P.
 ***Grayed cells corresponds to protein with only one T.U.P.

4.9 Figures

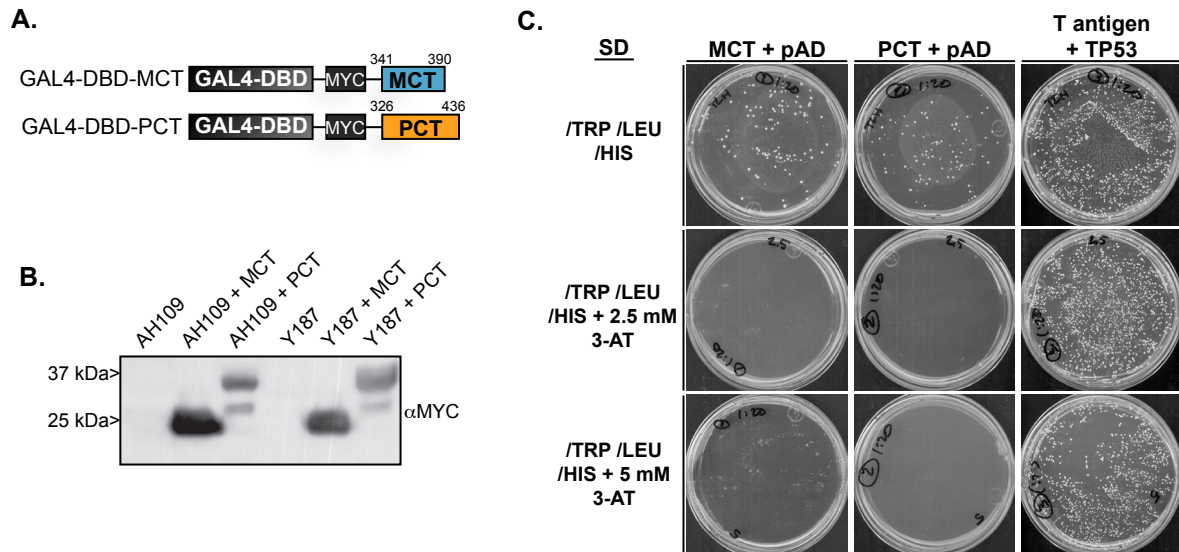


Figure 4.1 TALE CTD – GAL4 DBD constructs exhibit weak autonomous transactivation activity.

A) Schematic representation of the baits used in this study. The C-terminal domain of MEIS1 (MCT) and PKNOX1 (PCT) are cloned in frame downstream of the GAL4 DNA binding domain (DBD) and a MYC epitope. B) Western blot analysis performed on whole cell yeast extracts confirming the expression of TALE baits upon cDNA transfection in both yeast strains (Y187 and AH109) as detected by an anti-MYC antibody. C) Colony formation assay with mated yeasts expressing the TALE baits with the control GAL4 activation domain (pAD) and plated on the SD selective media with increasing amount of 3-AT competitor. The growth of TP53 + Large T antigen positive control on the right indicates sustained viability in the occurrence of a physical interaction.

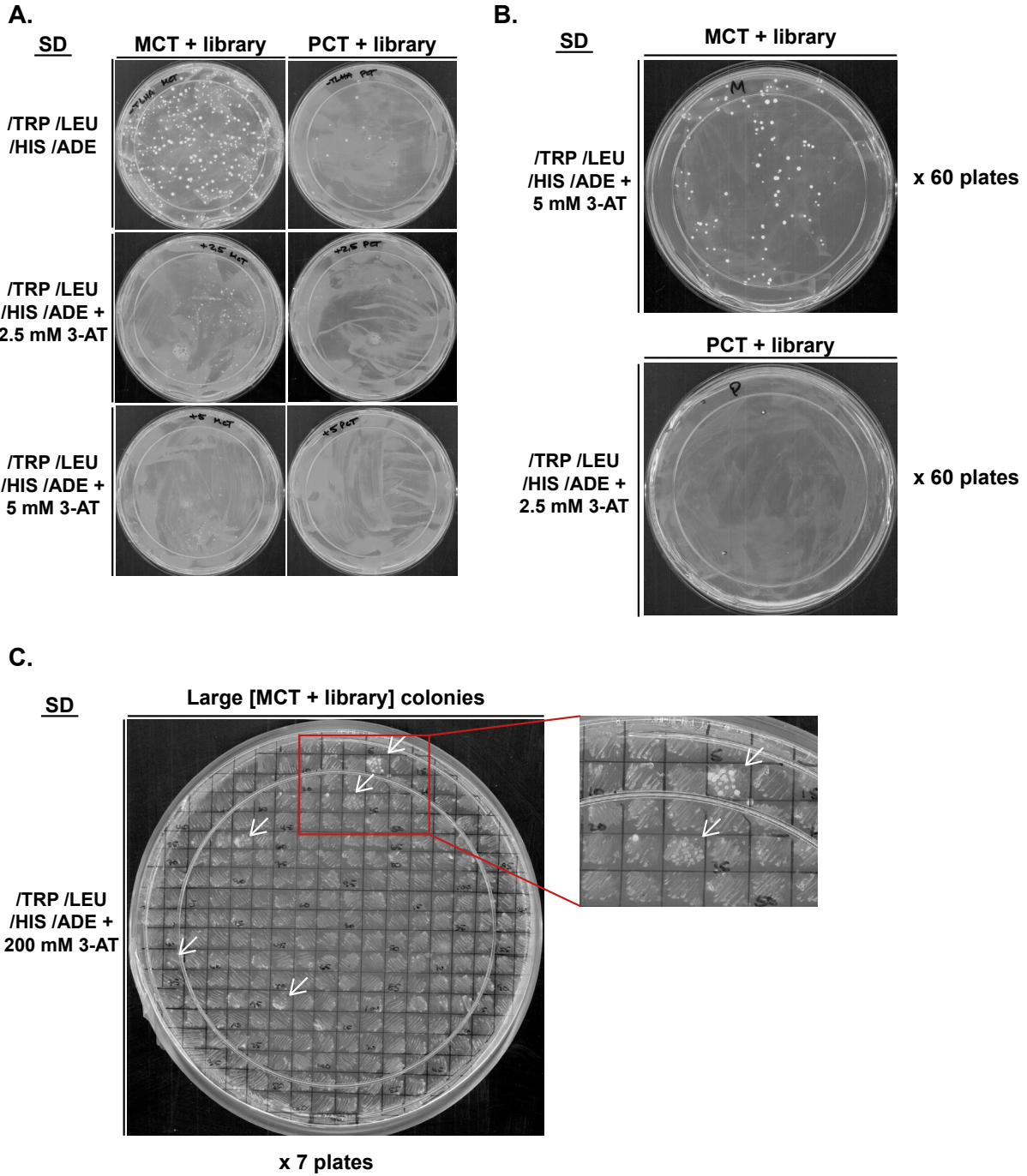


Figure 4.2 Screening of hematopoietic cDNA library reveals dramatic difference of resistant clones with MCT compared to PCT.

A) Colony formation assay with mated yeasts expressing the TALE baits with a sample of the cDNA library and plated on SD selective media containing increasing amount of 3-AT inhibitor.

B) Picture of typical plates of colony growth on SD selective media obtained upon screening

of cDNA library with the TALE baits. C) Colony formation assay of 1400 selected clones from MCT in B) restreaked on extremely stringent SD selection media containing 200 mM 3-AT.

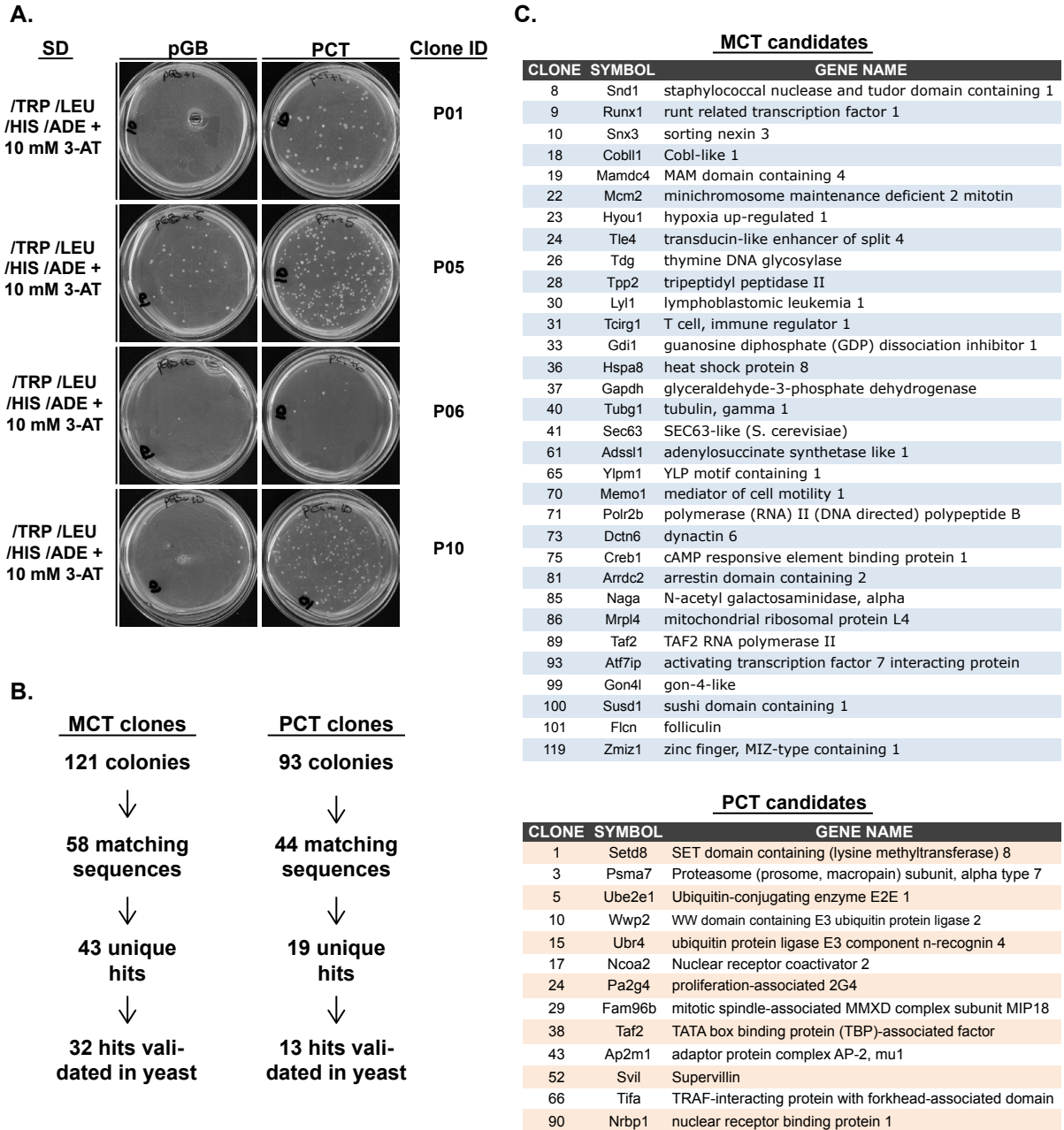


Figure 4.3 Yeast genetic validation of TALE-interacting candidates.

A) Examples of yeast colony formation assay using the PCT bait, or control DBD, with 4 candidates and plated on SD selective media. B) Summary of confirmation steps from cDNA clone identification to validation of interaction in the yeast reporter gene system. C) List of protein candidates interacting with the C-terminal domain of MEIS1 (upper panel) and PKNOX1 (lower panel).

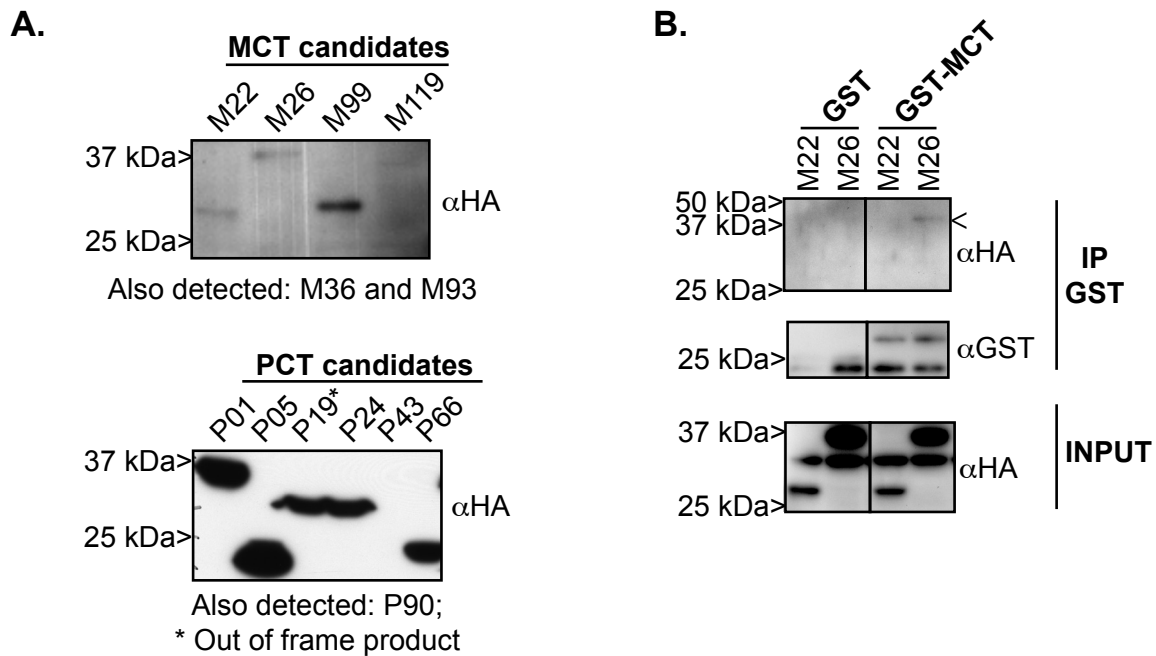


Figure 4.4 Confirmation of PPI between TALE CTDs and a subset of candidates in a mammalian expression system.

A) Western blot confirming mammalian expression of protein fragments from candidates identified with MEIS1 CTD (upper panel) and PKNOX1 CTD (lower panel). **B)** Co-immunoprecipitation experiment of HA-tagged candidates M22 and M26 by GST-tagged MEIS1 C-terminal domain using whole cell extracts from transiently transfected HEK293T cells (IP: 2 upper panels; INPUT: lower panel).

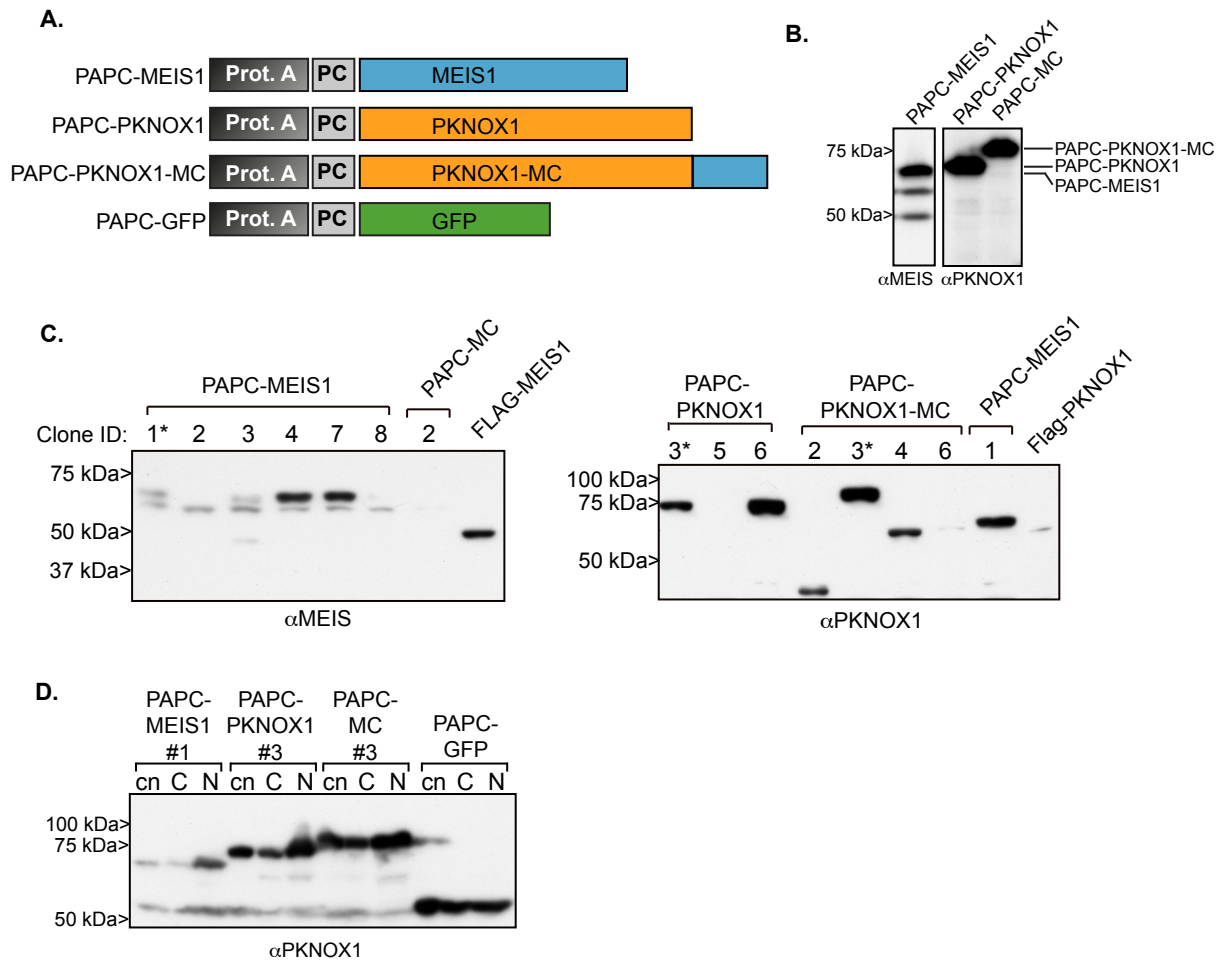


Figure 4.5 Stable clones express engineered PAPC-tagged TALE homeoproteins.

A) Schematic representation of the Protein A – Protein C epitope fused N-terminally of MEIS1, PKNOX1, PKNOX1-MC and GFP control. **B)** Western blots performed on whole cell extracts with an anti-MEIS1 (left panel) and anti-PKNOX1 (right panel) antibodies reveal correct expression of engineered tagged-TALE proteins. **C)** Western blot analysis performed on whole cell extracts with an anti-MEIS1 (left panel) and anti-PKNOX1 (right panel) antibodies from stable clones shows various expression levels of ectopic TALE cDNA. Asterisk indicates the selected clone for large-scale purification. Anti-PKNOX1 antibody recognizes the Protein A epitope. **D)** Western blots performed on extracts from different cell compartments: cyto-nucleoplasmic (CN), cytoplasmic (C) and nuclear (N). Ectopic expression of all constructs, including GFP, is detected in every cellular compartment using the PKNOX1 antibody.

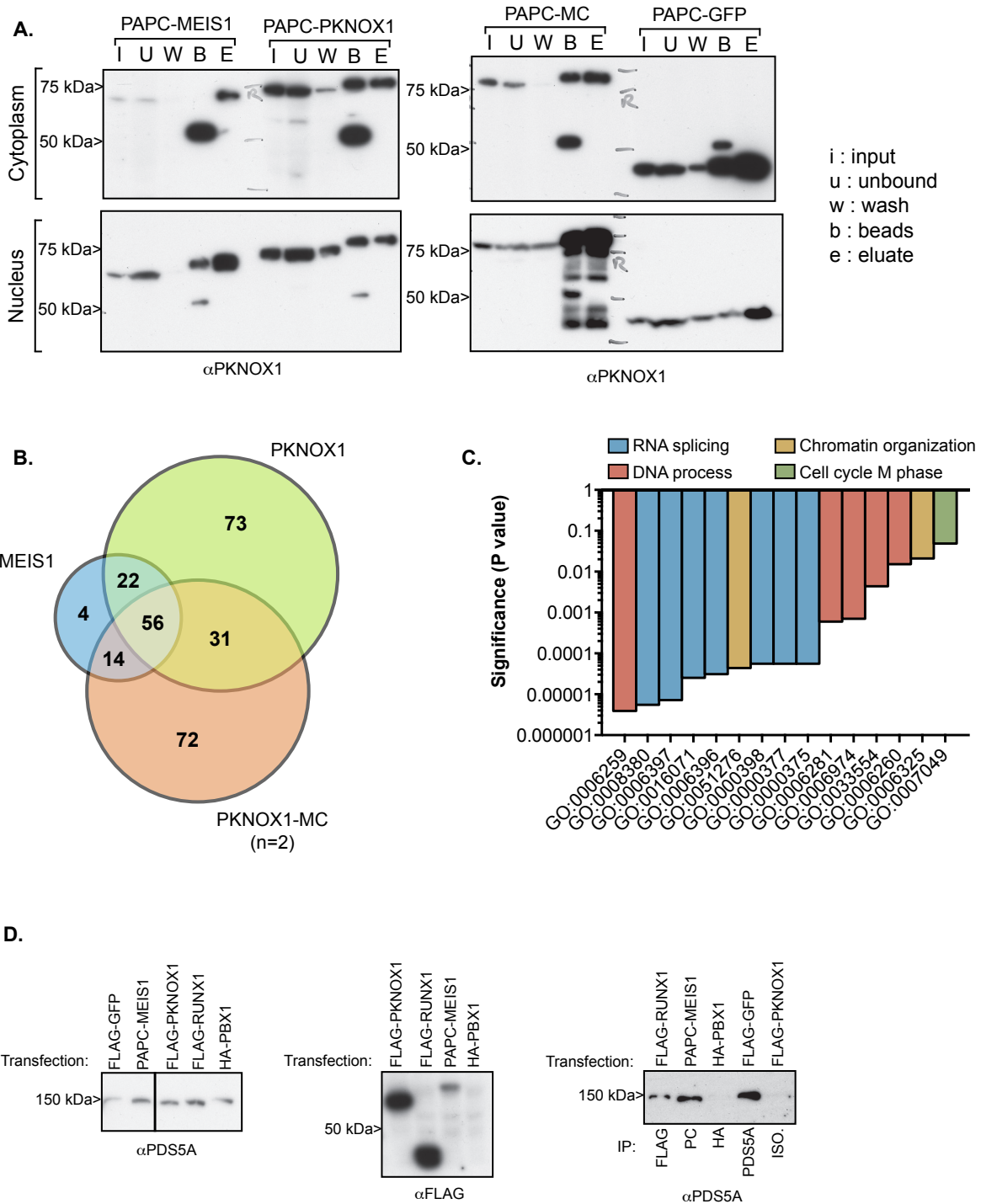


Figure 4.6 Large-scale complex purification of TALE protein partners uncovers common and new cellular functions.

A) Western blots performed using anti-PKNOX1 on aliquoted fractions from each step of the purification procedure and revealing recovery of tagged-protein (indicated on top). **B)** Venn diagram analysis showing the overlap between the TALE-interacting protein datasets. **C)** D.A.V.I.D.

GO term functional clustering analysis of proteins interacting with both MEIS1 and PKNOX1 reveals significant enrichment in RNA splicing, DNA-related processes, chromatin organization and M phase of the cell cycle. Statistical significance was calculated using the Benjamini False Discovery Rate. **D)** Western blots (left and middle panels) and co-immunoprecipitation experiments (right panel) performed on chromatin-bound protein extracts from HEK293 cells transfected with the constructs indicated on top. Immunoprecipitation was performed using the antibodies (including isotypic) indicated at the bottom.

4.10 Supplementary material

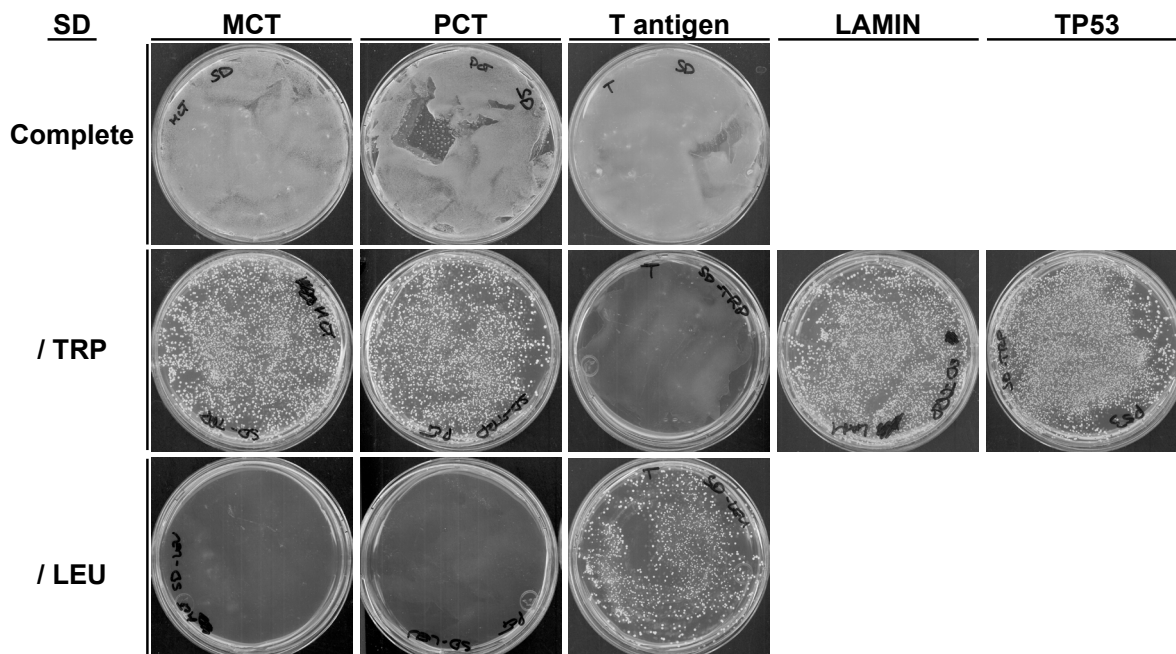


Figure S4.1 Expression of selective nutritional reporter genes.

Yeast colony growth assay using Y187 yeast strains transformed with the corresponding constructs and plated on minimal selective SD media. MCT, PCT, LAMIN and TP53 are in the pGBKT7 backbone containing the TRP1 marker whereas the Large T antigen is in the pADKT7 with the LEU2 marker.

Tableau S4.1 Functional GO term enrichment

Term	GO	Genes	Benjamini
GO:0006259~DNA metabolic process	GO:0006259	MRE11A, CTCF, HMG1, SMC3, RAD50, TFAM, UHRF1, SMARCB1, MDC1, RFC2, DNMT1, SMC1A, TOP2B, TOP2A, APEX1, FEN1	3.90835E-06
GO:0008380~RNA splicing	GO:0008380	BCAS2, CSTF3, SNRPB2, SKIV2L2, SF3B5, PRPF4, SF3A3, PPIH, DNAJC8, SRRM1, SMC1A, CPSF1, PRPF40A	5.52264E-06
GO:0006397~mRNA processing	GO:0006397	BCAS2, CSTF3, SNRPB2, SKIV2L2, SF3B5, PRPF4, SF3A3, PPIH, DNAJC8, SRRM1, SMC1A, CPSF1, PRPF40A	7.16233E-06
GO:0016071~mRNA metabolic process	GO:0016071	BCAS2, CSTF3, SNRPB2, SKIV2L2, SF3B5, PRPF4, SF3A3, PPIH, DNAJC8, SRRM1, SMC1A, CPSF1, PRPF40A	2.52793E-05
GO:0006396~RNA processing	GO:0006396	BCAS2, CSTF3, EXOSC9, EXOSC6, SNRPB2, SKIV2L2, SF3B5, PRPF4, SF3A3, PPIH, DNAJC8, SRRM1, SMC1A, CPSF1, PRPF40A	3.12082E-05
GO:0051276~chromosome organization	GO:0051276	MTA2, MRE11A, CTCF, HMG1, SMC3, RAD50, SMARCD2, BAZ1B, SMARCB1, SMARCA5, DNMT1, ACTL6A, SMC1A, TOP2A	4.3747E-05
GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome	GO:0000398	CSTF3, DNAJC8, SNRPB2, SRRM1, SF3B5, SMC1A, PRPF4, CPSF1, SF3A3	5.56181E-05
GO:0000377~RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	GO:0000377	CSTF3, DNAJC8, SNRPB2, SRRM1, SF3B5, SMC1A, PRPF4, CPSF1, SF3A3	5.56181E-05
GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions	GO:0000375	CSTF3, DNAJC8, SNRPB2, SRRM1, SF3B5, SMC1A, PRPF4, CPSF1, SF3A3	5.56181E-05
GO:0006281~DNA repair	GO:0006281	UHRF1, RFC2, MDC1, MRE11A, SMC1A, APEX1, TOP2A, SMC3, RAD50, FEN1	0.000599856
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	GO:0006974	UHRF1, BAZ1B, RFC2, MDC1, MRE11A, SMC1A, APEX1, TOP2A, SMC3, RAD50, FEN1	0.000706336
GO:0033554~cellular response to stress	GO:0033554	UHRF1, BAZ1B, RFC2, MDC1, MRE11A, EIF2AK2, SMC1A, APEX1, TOP2A, SMC3, RAD50, FEN1	0.004371332
GO:0006260~DNA replication	GO:0006260	TFAM, RFC2, MRE11A, HMG1, TOP2A, RAD50, FEN1	0.015310799
GO:0006325~chromatin organization	GO:0006325	BAZ1B, SMARCD2, SMARCB1, MTA2, SMARCA5, DNMT1, ACTL6A, CTCF, HMG1	0.021032551
GO:0007049~cell cycle	GO:0007049	CKAP2, UHRF1, NUMA1, PDS5A, MDC1, SMARCB1, MRE11A, PSME3, SMC1A, SEPT7, SMC3, RAD50	0.048663677

4.11 Acknowledgements

The authors thank Marie-Claude Sincennes for her assistance with yeast-two-hybrid experiments, Nadine Mayotte and Simon Girard for their excellent technical assistance. We also thank Éric Bonneil from the Proteomic core facility for conducting mass spectrometry analysis.

4.12 References

1. Mukherjee K, Bürglin T. Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution. *Journal of molecular evolution*. 2007;65(2):137-153.
2. Lu Q, Kamps M. Selective repression of transcriptional activators by Pbx1 does not require the homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(1):470-474.
3. Moskow J, Bullrich F, Huebner K, Daar I, Buchberg A. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(10):5434-5443.
4. Nakamura T, Largaespada D, Shaughnessy J, Jenkins N, Copeland N. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature genetics*. 1996;12(2):149-153.
5. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(1):224-234.
6. Mamo A, Krosil J, Kroon E, et al. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood*. 2006;108(2):622-629.
7. Wang G, Pasillas M, Kamps M. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood*. 2005;106(1):254-264.
8. Argiropoulos B, Palmqvist L, Yung E, et al. Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3. *Experimental hematology*. 2008;36(7):845-859.
9. Wong P, Iwasaki M, Somerville T, So C, So C, Cleary M. Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes & development*. 2007;21(21):2762-2774.
10. Dou Y, Hess J. Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia. *International journal of hematology*. 2008;87(1):10-18.
11. Li Z, Huang H, Li Y, et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients

with cytogenetically abnormal AML. *Blood*. 2012;119(10):2314-2324.

12. Dickson G, Liberante F, Kettyle L, et al. HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(8):1216-1225.

13. Li Z, Zhang Z, Li Y, et al. PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. *Blood*. 2013;121(8):1422-1431.

14. Longobardi E, Penkov D, Mateos D, De Florian G, Torres M, Blasi F. Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2014;243(1):59-75.

15. Saleh M, Huang H, Green N, Featherstone M. A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Experimental cell research*. 2000;260(1):105-115.

16. Saleh M, Rambaldi I, Yang X, Featherstone M. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(22):8623-8633.

17. Kilstrup-Nielsen C, Alessio M, Zappavigna V. PBX1 nuclear export is regulated independently of PBX-MEINOX interaction by PKA phosphorylation of the PBC-B domain. *The EMBO journal*. 2003;22(1):89-99.

18. Shanmugam K, Green N, Rambaldi I, Saragovi H, Featherstone M. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(11):7577-7588.

19. Ryoo H, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann R. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(22):5137-5148.

20. Mikkola I, Bruun J, Holm T, Johansen T. Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(6):4109-4118.

21. Bailey J, Rave-Harel N, McGillivray S, Coss D, Mellon P. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2004;18(5):1158-1170.

22. Rave-Harel N, Givens M, Nelson S, et al. TALE homeodomain proteins regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression independently and via interactions with

Oct-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(29):30287-30297.

23. Goh S-L, Looi Y, Shen H, et al. Transcriptional activation by MEIS1A in response to protein kinase A signaling requires the transducers of regulated CREB family of CREB co-activators. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(28):18904-18912.

24. Yamada T, Shimizu T, Sakurai T, et al. Physical and functional interactions between hematopoietic cell-specific ETS transcription factors and homeodomain proteins. *Leukemia research*. 2009;33(3):483-489.

25. Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood*. 2012;119(2):388-398.

26. Steinberg X, Hepp M, Fernández García Y, et al. Human CCAAT/enhancer-binding protein β interacts with chromatin remodeling complexes of the imitation switch subfamily. *Biochemistry*. 2012;51(5):952-962.

27. Swift G, Liu Y, Rose S, et al. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Molecular and cellular biology*. 1998;18(9):5109-5120.

28. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci C, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*. 2010;140(5):744-752.

29. Ku W-C, Chiu S-K, Chen Y-J, Huang H-H, Wu W-G, Chen Y-J. Complementary quantitative proteomics reveals that transcription factor AP-4 mediates E-box-dependent complex formation for transcriptional repression of HDM2. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(9):2034-2050.

30. Peng H, Slattery M, Mann R. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes & development*. 2009;23(19):2307-2319.

31. Díaz V, Bachi A, Blasi F. Purification of the Prep1 interactome identifies novel pathways regulated by Prep1. *Proteomics*. 2007;7(15):2617-2623.

32. Villaescusa J, Buratti C, Penkov D, et al. Cytoplasmic Prep1 interacts with 4EHP inhibiting Hoxb4 translation. *PloS one*. 2009;4(4).

33. Kros J, Mamo A, Chagraoui J, et al. A mutant allele of the Swi/Snf member BA-F250a determines the pool size of fetal liver hemopoietic stem cell populations. *Blood*. 2010;116(10):1678-1684.

34. Huang H, Paliouras M, Rambaldi I, Lasko P, Featherstone M. Nonmuscle myosin pro-

motes cytoplasmic localization of PBX. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(10):3636-3645.

35. Ferretti E, Villaescusa J, Di Rosa P, et al. Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(15):5650-5662.

36. Bisailon R, Wilhelm B, Kros J, Sauvageau G. C-terminal domain of MEIS1 converts PKNOX1 (PREP1) into a HOXA9-collaborating oncoprotein. *Blood*. 2011;118(17):4682-4689.

37. Bordeleau M-EE, Aucagne R, Chagraoui J, et al. UBAP2L is a novel BMI1-interacting protein essential for hematopoietic stem cell activity. *Blood*. 2014.

38. Simon C, Chagraoui J, Kros J, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes & development*. 2012;26(7):651-656.

39. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989;340(6230):245-246.

40. Chan K-L, Gligoris T, Upcher W, et al. Pds5 promotes and protects cohesin acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(32):13020-13025.

41. Put N, Van Roosbroeck K, Vande Broek I, Michaux L, Vandenberghe P. PDS5A, a novel translocation partner of MLL in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*. 2012;36(4):9.

42. Close P, East P, Dirac-Svejstrup A, et al. DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature*. 2012;484(7394):386-389.

43. Panigrahi A, Zhang N, Otta S, Pati D. A cohesin-RAD21 interactome. *The Biochemical journal*. 2012;442(3):661-670.

44. Longobardi E, Blasi F. Overexpression of PREP-1 in F9 teratocarcinoma cells leads to a functionally relevant increase of PBX-2 by preventing its degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(40):39235-39241.

45. von Burstin J, Reichert M, Wescott M, Rustgi A. The pancreatic and duodenal homeobox protein PDX-1 regulates the ductal specific keratin 19 through the degradation of MEIS1 and DNA binding. *PloS one*. 2010;5(8).

46. Brown S, Stoilov P, Xing Y. Chromatin and epigenetic regulation of pre-mRNA processing. *Human molecular genetics*. 2012;21(R1):6.

47. Jones P. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.

Nature reviews Genetics. 2012;13(7):484-492.

48. Feeney K, Wasson C, Parish J. Cohesin: a regulator of genome integrity and gene expression. *The Biochemical journal*. 2010;428(2):147-161.
49. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
50. Cancer Genome Atlas Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(22):2059-2074.
51. Rhodes J, McEwan M, Horsfield J. Gene regulation by cohesin in cancer: is the ring an unexpected party to proliferation? *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(12):1587-1607.
52. Kim Y, Cecchini K, Kim T. Conserved, developmentally regulated mechanism couples chromosomal looping and heterochromatin barrier activity at the homeobox gene A locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(18):7391-7396.
53. Horsfield J, Anagnostou S, Hu J, et al. Cohesin-dependent regulation of Runx genes. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134(14):2639-2649.
54. Rhodes J, Bentley F, Print C, et al. Positive regulation of c-Myc by cohesin is direct, and evolutionarily conserved. *Developmental biology*. 2010;344(2):637-649.
55. Faure A, Schmidt D, Watt S, et al. Cohesin regulates tissue-specific expression by stabilizing highly occupied cis-regulatory modules. *Genome research*. 2012;22(11):2163-2175.
56. Schmidt D, Schwalie P, Ross-Innes C, et al. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome research*. 2010;20(5):578-588.
57. Kagey M, Newman J, Bilodeau S, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 2010;467(7314):430-435.
58. Hakimi M-A, Bochar D, Schmiesing J, et al. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature*. 2002;418(6901):994-998.
59. Stopka T, Zakova D, Fuchs O, et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia*. 2000;14(7):1247-1252.
60. Krasteva V, Buscarlet M, Diaz-Tellez A, Bernard MA, Crabtree GR, Lessard JA. The

BAF53a subunit of SWI/SNF-like BAF complexes is essential for hemopoietic stem cell function. *Blood*. 2012;120(24):4720-4732.

61. Gomes N, Espinosa J. Gene-specific repression of the p53 target gene PUMA via intragenic CTCF-Cohesin binding. *Genes & development*. 2010;24(10):1022-1034.
62. Shukla S, Kavak E, Gregory M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011;479(7371):74-79.
63. McCracken S, Longman D, Marcon E, et al. Proteomic analysis of SRm160-containing complexes reveals a conserved association with cohesin. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(51):42227-42236.
64. Maciejewski J, Padgett R. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *British journal of haematology*. 2012;158(2):165-173.
65. Günther K, Rust M, Leers J, et al. Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic acids research*. 2013;41(5):3010-3021.
66. Le Guezennec X, Vermeulen M, Brinkman A, et al. MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(3):843-851.
67. Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson S, Mann M, Kouzarides T. Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*. 2010;143(3):470-484.
68. Spruijt C, Gnerlich F, Smits A, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*. 2013;152(5):1146-1159.
69. Rais Y, Zviran A, Geula S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 2013;502(7469):65-70.
70. Shimbo T, Du Y, Grimm S, et al. MBD3 localizes at promoters, gene bodies and enhancers of active genes. *PLoS genetics*. 2013;9(12).
71. van den Berg D, Snoek T, Mullin N, et al. An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 2010;6(4):369-381.
72. Sjolund A, Senejani A, Sweasy J. MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutation research*. 2013;743-744:12-25.
73. Penkov D, Mateos San Martín D, Fernandez-Díaz L, et al. Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific

interactions with Hox genes/proteins. *Cell reports*. 2013;3(4):1321-1333.

74. Kulis M, Queirós A, Beekman R, Martín-Subero J. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(11):1161-1174.

75. Huang H, Rastegar M, Bodner C, Goh S-L, Rambaldi I, Featherstone M. MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10119-10127.

CHAPITRE 5. DISCUSSION

Les homéoprotéines HOX et leurs cofacteurs sont des régulateurs essentiels au développement embryonnaire et au maintien des tissus chez l'adulte où elles exercent des fonctions déterminantes sur le destin cellulaire. Leur dérégulation est associée au développement de cancers dont la leucémie myéloïde aigüe et il est par conséquent primordial de bien comprendre leur mode de régulation et leur mécanisme d'action. Les travaux présentés dans cette thèse visent à explorer différentes fonctions cellulaires exercées par le cofacteur MEIS1 en tenant compte de son homologie avec PREP1 et de son affinité pour les protéines PBX. La compréhension des modes de régulations prodigués par ces cofacteurs aurait des impacts majeurs sur une grande diversité de systèmes biologiques.

5.1 Fonctions de MEIS et PREP dans la leucémie myéloïde aigüe

5.1.1 Fonction de transactivation

MEIS1 et PREP1 exercent des fonctions opposées dans le système hématopoïétique qui se traduisent par une accélération distincte de la leucémogénèse induite par HOXA9 dans un système expérimental de gain-de-fonction. Les résultats des travaux présentés au Chapitre 2 démontrent à l'aide de deux mutants PREP1 que cette différence fonctionnelle est attribuable à la présence d'un domaine de transactivation explanté sur le domaine C-terminal de PREP1. Des études précédentes avaient déjà fait état de l'importance d'une activité transactivatrice au sein de la protéine MEIS1 pour maximiser son potentiel de transformation, soit par une ablation du domaine C-terminal soit par la fusion avec un domaine répresseur dominant (M33, Engrailed).^{239,241,295,296} Ce résultat est important dans la mesure où il identifie fonctionnellement une région protéique précise responsable d'une activité distincte entre deux protéines partageant la capacité d'interagir avec des partenaires communs (PBX) ou de lier les mêmes séquences d'ADN cibles par leurs domaines conservés (HM et HD, respectivement). Ces données mises ensemble pointent vers un modèle où MEIS1 et PREP1 compétitionneraient pour la régulation de l'expression de gènes cibles en coopération avec les membres de la famille PBC. Leur domaine C-terminal divergent apporterait par conséquent une régulation spécifique à chacun d'eux. En somme, ces expériences soulignent l'importance d'élucider les mécanismes régulant la fonction de transactivation du domaine C-terminal de MEIS1.

On se doit de souligner une étude qui montre une stimulation de la transcription de gène rapporteur en ajoutant le facteur PREP1 à un dimère PBX-HOX.²⁵⁵ Cette observation suggère que PREP1 est également impliqué, directement ou non, dans la transcription. À cet égard, il est intéressant de constater qu'en conditions expérimentales *in vitro*, ni MEIS1 ni PREP1 n'ont la capacité d'induire l'expression de gène rapporteur, alors qu'une stimulation à la TSA ou suite à l'expression ectopique de PKA, MEIS1 devient transactivateur, suggérant la présence requise d'événements de signalisation en amont de l'activation transcriptionnelle. On ne peut donc pas exclure que dans les conditions cellulaires appropriées, PREP1 puisse également activer la transcription comme il le fut observé dans l'étude ci-mentionnée. On ne peut également exclure la possibilité que PREP1 ne puisse influencer la transcription qu'indirectement par une altération (conformation, recrutement de modificateurs post-traductionnels, etc.) à une protéine PBX ou un dimère PBX-HOX. Ces possibilités ne sont pas en désaccord avec notre modèle de compétition proposé ci-dessus.

Ce mystérieux potentiel de transactivation par PREP1 pourrait également expliquer, du moins en partie, la faible accélération leucémogénique induite par le mutant PREP1-SW, lequel possède le C-terminal de MEIS1 à la place du sien. Effectivement, il est possible que ce soit les deux domaines de transactivation combinés qui permettent d'activer le programme transcriptionnel leucémique de PREP1. Cette hypothèse est supportée par la forte transactivation et la transformation leucémique subséquente de PREP-VP16+HOXA9. La stabilité de la protéine ne semble pas un facteur puisqu'on retrouve de grande quantité de PREP1-SW dans la moelle plusieurs mois après la transplantation. Mais alors, si le C-terminal de MEIS1 est suffisant pour transformer les cellules hématopoïétiques avec HOXA9 mais qu'il n'est pas suffisant sur une protéine comme PREP1, il doit forcément exister d'autres différences importantes entre ces deux protéines. Cette suggestion est également supportée par l'observation qu'une fusion VP16-MEIS transforme indépendamment de la surexpression de HOXA9 tandis qu'une fusion PREP1-VP16 en est incapable. Des expériences supplémentaires seront requises pour comprendre le rôle du C-terminal de PREP1 dans l'accomplissement de ses fonctions biologiques.

Notre modèle d'étude présente évidemment des limites, la principale étant les niveaux d'expression probablement excessifs des protéines dans les cellules de moelle. Particulièrement si l'un des gènes à l'étude montre une propension à induire l'apoptose lorsqu'il est exprimé à de trop hauts niveaux dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris.²³⁶ Ce résultat aurait pu

fâcheusement fausser l'interprétation des courbes de survie mais la détection de la protéine avec l'étiquette FLAG dans les cellules de moelle de souris plusieurs mois suivant la transplantation suggère que dans notre système, PREP1 n'induit pas une mort cellulaire des cellules qui l'exprime de manière ectopique. Des études directes de marquage à l'Annexin V et d'iodure de propidium (PI), par exemple, permettraient de clarifier ce point dans les cellules hématopoïétiques.

Suite à la publication de cet article, l'un de nos collaborateurs a directement supporté notre modèle de compétition entre MEIS1 et PREP1. Il a en effet montré dans des cellules fibroblastiques de souris *PREP1^{+/i}* que les niveaux d'expression de MEIS1 étaient inversement corrélés avec les niveaux de PREP1 et que cette relation était dépendante de PBX. De plus, des niveaux diminués de PREP1, ou l'expression d'un PREP1 mutant incapable d'interagir avec PBX, rendent MEIS1 suffisant pour induire la transformation.³⁰⁷ Ces résultats supportent le concept que MEIS1 et PREP1 compétitionnent pour l'interaction avec PBX dans l'accomplissement de processus cellulaires diamétralement opposés. Ils suggèrent également, même si ce ne fut pas testé, que les niveaux de PBX pourraient être limitants et ainsi régulateurs des fonctions susmentionnées.

Ce ne serait pas la première fois qu'une troïka régulatrice similaire aurait été observée. En effet, les protéines MAD/MAX/MYC présentent une dynamique d'interaction à tous points comparables à PREP/PBX/MEIS. En effet, la protéine MAX a la capacité d'interagir avec elle-même ainsi qu'avec MAD ou MYC avec pour conséquence des fonctions dans la suppression de tumeurs ou dans le développement de cancers, respectivement. De plus, les dimères MAD-MAX et MYC-MAX reconnaissent les mêmes séquences d'ADN mais répondent différemment aux stimulations mitogéniques.³⁰⁸ Ce parallèle est impressionnant de similitudes et suggère fortement que PREP/PBX/MEIS sont les *alter ego* TALE des régulateurs MAD/MAX/MYC. Ce niveau de régulation s'ajoute à une liste déjà longue des moyens employés par les cellules pour contrôler les fonctions de ces homéoprotéines.

5.1.2 Gènes cibles

Notre étude transcriptomique par micropuce d'ADN a permis d'identifier le programme transcriptionnel actif des cellules hématopoïétiques pré-transformées quelques jours suivant leur transduction par les cDNA de *HOXA9* ainsi que de *MEIS1*, *PREP1* ou *PREP1-MC*. À un stade aussi précoce, on remarque déjà une réponse pro-proliférative en présence de MEIS1 et PREP1-MC, ce qui correspond bien au phénotype pro-leucémique observé en collaboration

avec HOXA9. Au moment de publier ces travaux, peu de chose étaient connues concernant les sites de liaisons à l'ADN de MEIS1 ou de PREP1. Seules quelques analyses transcriptomiques à partir de micropuces à ADN avaient été publiées, générant ainsi de courtes listes identifiant quelques gènes cibles potentiels. Ces listes n'avaient malheureusement que peu de gènes en commun suggérant que la variabilité des divers systèmes expérimentaux employés était associée à des réponses transcriptomiques significativement différentes. Les résultats de notre article ne font pas exception. Seuls quelques rares gènes avaient été identifiés dans l'une ou l'autre des études précédentes, suggérant que le programme transcriptionnel impliqué dans l'accélération de leucémies pouvait difficilement se comparer d'un système à l'autre. Malgré tout, des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire étaient régulièrement identifiés.²⁴¹

Depuis la publication de ces travaux deux articles ont rapporté une étude à grande échelle des sites de liaison de MEIS1 à l'ADN, permettant de dresser un portrait plus complet de ses propriétés transcriptionnelles. On rapporte d'abord l'identification des sites de MEIS1 et de HOXA9 dans un contexte de cellules pré-leucémiques primaires. Les auteurs montrent que le tiers des sites liés par MEIS1 sont également liés par HOXA9 et que surprenamment, 95% de ces sites communs ne se retrouvent pas près des sites d'initiation de la transcription (TSS). On les localise plutôt à des fréquences comparables dans des sites intra-géniques et distaux inter-géniques. Ces sites relativement bien conservés portent notamment la marque épigénétique H3K4me1 ainsi qu'une forte acétylation de H3/H4 associée avec un recrutement de CREBBP/P300, suggérant une nature d'amplificateur. L'analyse transcriptionnelle des gènes correspondant effectuée à la suite d'une inactivation aigüe de HOXA9 révéla la régulation d'une signature d'auto-renouvellement avec baisse d'expression de *CD34*, *ERG*, *FLT3* et *LMO2* ainsi qu'une augmentation de *RUNX1*.²⁷⁹ Ces résultats ont été partiellement supportés par une autre étude des sites de liaison des PREP, MEIS et PBX1, cette fois dans un contexte embryonnaire au stade E11.5. Les auteurs révélèrent que des 10 000+ sites identifiés par ces trois classes d'homéoprotéines, la majorité était exclusive à un seul facteur. Leur résultat le plus intéressant à mon sens (et dans l'optique de cette thèse) restera les différentes préférences de liaison entre MEIS1 et PREP1. On note d'abord que MEIS1 est plus fréquemment lié seul qu'en dimère avec PBX à l'ADN (85% par rapport à 50% pour PREP1), suggérant qu'il exerce certaines fonctions indépendantes. De plus, alors que les dimères PBX-PREP (3x fois plus fréquents que les dimères PBX-MEIS) et les sites uniques à PREP1 représentent 85% des sites près des TSS, les sites MEIS-PBX ou MEIS seul quant à eux ne représentent que moins de 10% des sites TSS

identifiés. En revanche, MEIS-PBX et MEIS se retrouvaient principalement dans les régions éloignées inter-géniques, en compagnie des HOX, supportant la préférence de MEIS pour les amplificateurs. Finalement, la classification fonctionnelle des gènes identifiés révèle que MEIS régule des processus liés à la prolifération et la spécification embryonnaire tandis que PREP module davantage l'expression de gènes impliqués dans les processus cellulaires de base tel que le transport cellulaire et la transmission des signaux intracellulaires.²⁹⁴ Ces résultats sont en accord avec les dynamiques d'expression de ces cofacteurs, PREP1 étant exprimé faiblement mais de façon ubiquitaire tandis que MEIS1 est exprimé de façon restrictive et transitoire. Il est donc possible que ces cofacteurs aient évolué d'un ancêtre commun pour accomplir des fonctions similaires sur des gènes différents. Leurs analyses de séquences consensus révèlent d'ailleurs une préférence non-partagée entre MEIS1 et PREP1.

5.2 Du BRET aux leucémies

5.2.1 Inhibiteurs de MEIS-PBX

De plus en plus de projets exploitent la robustesse et la rapidité de la technique du BRET pour effectuer des criblages à haut-débit.³⁰⁹ Inspiré, j'ai réussi à développer un nouvel essai de BRET permettant la détection de l'interaction MEIS1-PBX1 dans des cellules vivantes et de l'exploiter pour cribler une librairie de 115 000+ composés chimiques. Les objectifs étaient de développer de nouveaux outils nous permettant d'étudier leurs fonctions de même que de découvrir des inhibiteurs spécifiques en vue d'un traitement éventuel des leucémies qui en expriment de hauts niveaux. Au moment d'écrire ces lignes, une vingtaine de composés sont encore à l'étude. Nous prévoyons soumettre les plus intéressants candidats à quelques rondes d'optimisation de type « structure-activité », où les groupements d'atomes responsables de l'activité sont identifiés tandis que les autres sont modifiés pour altérer diverses propriétés (toxicité, affinité, etc.). L'étape suivante consistera à tester la capacité des antagonistes à inhiber le maintien et la prolifération de leucémies humaines primaires. En effet, il est maintenant possible dans le laboratoire de maintenir en culture des échantillons leucémiques grâce à un traitement combiné des composés SR1 et de UM729 (Fares, I., *et al.*, 2014, *Science*, et ³⁴). Le transcriptome de ces échantillons est déjà séquencé et pourra être utilisé pour séparer la cohorte de leucémies en fonction des niveaux de HOX/MEIS/PBX bas (groupe contrôle) et élevés (groupe test). Advenant une activité anti-proliférative spécifique, et des propriétés pharmacocinétiques acceptables, les composés pour-

ront être administrés à des souris receveuses de xéno greffes afin d'en déterminer les propriétés anti-leucémiques. En somme, ce projet représente un bel exemple d'étude préclinique basée sur l'analyse mécanistique d'une interaction protéine-protéine.

Ces travaux sont en lien avec un engouement récent envers l'inhibition du complexe HOX/MEIS/PBX et qui a mené au développement récent d'un inhibiteur peptidique de 2.7 kDa, HXR9, capable d'interférer avec les interactions protéiques HOX-PBX.³¹⁰ Ce dernier a déjà montré un potentiel intéressant pour entraver à différents niveaux la croissance de cellules de tumeurs provenant de différents tissus comme les cancers de la peau, de la prostate, du pancréas, du sein, de l'ovaire et du poumon.³¹⁰⁻³¹⁴ On rapporte également des inhibiteurs démontrant des effets antiprolifératifs sur des cellules exprimant de hauts niveaux de HOX mais qui sont spécifiques pour d'autres cibles: SU11274 (c-MET), Entinostat (HDAC), UNC0638 (G9A), LY294002 (PI3K) et flavopiridol (CDK9).^{242,270,315-317} Ces études et leurs résultats suggèrent que le complexe HOX-MEIS-PBX constitue une cible légitime pour un traitement anticancéreux.

Il est aussi curieux de constater que contrairement à son rôle dans le programme d'auto-renouvellement hématopoïétique, MEIS1 semble jouer un rôle opposé dans le tissu cardiaque.³¹⁸ En effet, une inactivation de MEIS1 permettrait aux cardiomyocytes de réintégrer le cycle cellulaire afin de régénérer un tissu endommagé. Considérant que l'effet d'une inactivation embryonnaire de MEIS1 sur le développement cardiaque ressemble à celui des PBX, et que le profil d'expression de MEIS1 chez les souris post-natales coïncide avec celui de HOXA10, HOXA11 et HOXD12, il est tentant de croire que le complexe HOX/MEIS/PBX est actif dans les cardiomyocytes et que son inhibition puisse favoriser la récupération suivant des traumatismes cardiaques.³¹⁹

5.2.2 Spécificité des interactions TALE-TALE

L'antagonisme direct d'une interaction protéine-protéine peut se faire selon deux modes différents. L'inhibiteur peut se lier directement à l'interface des domaines en contact et perturber les interactions entre ces derniers. Alternativement, la molécule peut se lier à un site allostérique et provoquer un changement de conformation empêchant la liaison des domaines d'interaction. Nous prévoyons déterminer le mode d'inhibition des molécules identifiés dans le criblage à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (NMR). Dans les deux cas, il serait possible d'identifier des molécules antagonistes spécifiques à un dimère TALE-TALE donné. Effectivement, les régions adjacentes au domaine HM sont très peu conservées entre MEIS et PREP1 et pour-

raient représenter des sites de liaison allostériques distincts. Alternativement, les domaines HM de MEIS1 et PREP1 ne sont pas identiques et partagent environ 60% d'identité de séquence. Il est donc possible qu'une molécule soit apte à antagoniser la formation d'un dimère PBX-MEIS tout en préservant l'interaction PBX-PREP. Ces hypothèses de type « pensée magique » seront réévaluées au cours de la progression des étapes de caractérisation. Même si une telle spécificité s'avère difficile à atteindre, n'en demeure pas moins qu'une stabilisation du complexe PREP-PBX représenterait une bonne stratégie thérapeutique anti-leucémie. Tel que mentionné dans l'introduction, il est possible de combiner des domaines modulaires des protéines fluorescentes par complémentarité de l'activité permettant ainsi de réaliser du BRET avec plus de deux partenaires.³⁰² Il serait dès lors théoriquement possible de déterminer la quantité de trimères HOX-MEIS-PBX présents dans une population de cellules en réponse à différents traitements.

5.3 Nouvelles fonctions pour les homéoprotéines

Malgré le fait que les résultats obtenus dans les expériences du chapitre 4 soient préliminaires, nous avons plusieurs raisons de croire qu'au moins un sous-groupe de ces candidats soient de véritables partenaires d'interaction : 1) Les protéines PBX ont été les partenaires identifiés avec le plus de robustesse, signifiant que notre approche expérimentale est solide; 2) PSMA7, une sous-unité du protéasome, a été identifié dans le criblage de double-hybride de même que dans la purification de complexe comme interacteur spécifique à PREP1. Curieusement, PREP1 semble impliqué dans la stabilité des protéines PBX en prévenant leur dégradation par le protéasome par l'entremise d'un mécanisme encore indéfini.³²⁰ 3) Nous avons identifié des protéines impliquées dans la reconnaissance de l'ADN méthylé/déméthylé. Deux articles récents ont démontré l'association de MEIS1-PBX1 et de PREP1-PBX1 dans la reconnaissance (directe ou non) de l'ADN méthylé.^{321,322} 4) Nous avons identifié la protéine CREB1 comme interagissant avec le C-terminal de MEIS1. Une telle interaction a déjà été montrée dans des cellules mammifères.²⁷²

Il est intéressant de constater que les candidats identifiés dans cette expérience peuvent être classés dans des groupes fonctionnels rappelant ceux des gènes qui ont été récemment impliqués dans la leucémogenèse. En effet, des gènes codant pour des protéines participant à des processus tels que l'épissage d'ARN, la méthylation/déméthylation de l'ADN et le complexe des cohésines, sont le site de mutations somatiques récurrentes chez les patients atteints de LMA.²⁰ Sans être exactement les mêmes facteurs, les candidats identifiés avec le plus de robustesse dans notre expérience de purification de complexe sont impliqués dans ces mêmes proces-

sus. Il est encore trop tôt pour spéculer quant aux fonctions que ces interactions avec les TALE pourraient avoir dans les processus cellulaires. Nous sommes toutefois enthousiastes face à ces résultats pour deux raisons. Premièrement, il semble de plus en plus établi que ces processus cellulaires sont intimement interconnectés. Et deuxièmement, un nombre croissant de publications rapporte des liens fonctionnels entre les membres de ces groupes et le développement de leucémies.^{323,324}

5.4 Conclusion

Les analyses transcriptomiques confirment que les homéoprotéines MEIS et PBX sont fortement exprimées dans les leucémies myéloïdes aigües. Leur rôle direct dans le développement de cancers dans des modèles murins suggère que ce complexe représente une cible thérapeutique de choix. Une vingtaine de composés démontrant une activité antagoniste envers la dimérisation PBX-MEIS pourra rapidement être validée sur des échantillons leucémiques primaires.

L'étude d'explantation du domaine C-terminal de MEIS1 sur PREP1 confirme son importance dans la collaboration avec les HOX dans le développement de leucémies myéloïdes aigües et souligne le besoin d'en comprendre les différents modes d'activation. L'identification de partenaires interagissant directement avec ce domaine, comme MBD3 ou CREB1, fournira potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'accessibilité grandissante des plateformes de criblage à haut-débit de même que le développement constant de banques de molécules chimiques toujours plus complètes et variées facilitent l'initiation de tel projet à vocation thérapeutique. Un des grands défis de la recherche clinique pour l'avenir sera d'assurer la mise en place d'un réseau solide capable d'assumer l'expérimentation à grande échelle, l'analyse d'un gros volume de données de même que l'optimisation des molécules chimiques tout en facilitant la transition vers les études précliniques.

Bibliographie

1. Pulte D, Gondas A, Brenner H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica*. 2008;93(4):594-600.
2. Loose M, Swiers G, Patient R. Transcriptional networks regulating hematopoietic cell fate decisions. *Current opinion in hematology*. 2007;14(4):307-314.
3. Druker B, Talpaz M, Resta D, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1031-1037.
4. Stone R, O'Donnell M, Sekeres M. Acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2004:98-117.
5. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*. 1976;33(4):451-458.
6. Vardiman J, Harris N, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302.
7. Gahn B, Haase D, Unterhalt M, et al. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia*. 1996;10(6):946-951.
8. Smith S, Le Beau M, Huo D, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43-52.
9. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(4):233-245.
10. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(20):2758-2765.
11. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012;120(15):2963-2972.
12. Li Z, Herold T, He C, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that im-

proves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(9):1172-1181.

13. Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2004;350(16):1605-1616.

14. Weber S, Alpermann T, Dicker F, et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal*. 2014;4.

15. Metzeler K, Maharry K, Kohlschmidt J, et al. A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27(10):2023-2031.

16. Rockova V, Abbas S, Wouters B, et al. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood*. 2011;118(4):1069-1076.

17. Ley T, Mardis E, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.

18. Ley T, Ding L, Walter M, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2010;363(25):2424-2433.

19. Mardis E, Ding L, Dooling D, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1058-1066.

20. Cancer Genome Atlas Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(22):2059-2074.

21. Wu H, Coskun V, Tao J, et al. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science (New York, NY)*. 2010;329(5990):444-448.

22. Przychodzen B, Jerez A, Guinta K, et al. Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*. 2013;122(6):999-1006.

23. Visconte V, Rogers H, Singh J, et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of

- ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(16):3173-3186.
24. Ding L, Ley T, Larson D, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-510.
 25. Wang H, Li W, Guo R, et al. An intragenic long noncoding RNA interacts epigenetically with the RUNX1 promoter and enhancer chromatin DNA in hematopoietic malignancies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014.
 26. Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997;3(7):730-737.
 27. Sarry J-E, Murphy K, Perry R, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(1):384-395.
 28. Heuser M, Yun H, Berg T, et al. Cell of origin in AML: susceptibility to MN1-induced transformation is regulated by the MEIS1/AbdB-like HOX protein complex. *Cancer cell*. 2011;20(1):39-52.
 29. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down J. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(13):5431-5436.
 30. Guan Y, Gerhard B, Hogge D. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(8):3142-3149.
 31. Eppert K, Takenaka K, Lechman E, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature medicine*. 2011;17(9):1086-1093.
 32. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(2):93-106.
 33. Hawley R, Fong A, Burns B, Hawley T. Transplantable myeloproliferative disease induced in mice by an interleukin 6 retrovirus. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(4):1149-1163.
 34. Pabst C, Krosch J, Fares I, et al. Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo. *Nature methods*. 2014;11(4):436-442.
 35. Lewis E. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978;276(5688):565-570.
 36. Kaufman T, Lewis R, Wakimoto B. Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in DRO-

SOPHILA MELANOGASTER: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics*. 1980;94(1):115-133.

37. McGinnis W, Levine M, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring W. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*. 1984;308(5958):428-433.

38. Otting G, Qian Y, Billeter M, Müller M, Affolter... M. Protein--DNA contacts in the structure of a homeodomain--DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *The EMBO ...* 1990.

39. Passner J, Ryoo H, Shen L, Mann R, Aggarwal A. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*. 1999;397(6721):714-719.

40. Bürglin T. Homeodomain subtypes and functional diversity. *Sub-cellular biochemistry*. 2011;52:95-122.

41. Freyd G, Kim S, Horvitz H. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*. 1990;344(6269):876-879.

42. Herr W, Sturm R, Clerc R, et al. The POU domain: a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2*, and *Caenorhabditis elegans* *unc-86* gene products. *Genes & development*. 1988;2(12A):1513-1516.

43. Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc R. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(52):31178-31188.

44. Burri M, Tromvoukis Y, Bopp D, Frigerio G, Noll M. Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *The EMBO journal*. 1989;8(4):1183-1190.

45. Neufeld E, Skalnik D, Lievens P, Orkin S. Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein, *cut*. *Nature genetics*. 1992;1(1):50-55.

46. Sidow A. Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Current opinion in genetics & development*. 1996;6(6):715-722.

47. Montavon T, Duboule D. Chromatin organization and global regulation of Hox gene clusters. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1620):20120367.

48. Zakany J, Duboule D. The role of Hox genes during vertebrate limb development.

Current opinion in genetics & development. 2007;17(4):359-366.

49. Grier D, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle G, Halliday H, Lappin T. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *The Journal of pathology*. 2005;205(2):154-171.
50. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5631):331-333.
51. Yekta S, Shih IH, Bartel D. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science (New York, NY)*. 2004;304(5670):594-596.
52. Wang K, Yang Y, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. 2011;472(7341):120-124.
53. Rinn J, Kertesz M, Wang J, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-1323.
54. Yekta S, Tabin C, Bartel D. MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(10):789-796.
55. Coulombe Y, Lemieux M, Moreau J, et al. Multiple promoters and alternative splicing: Hoxa5 transcriptional complexity in the mouse embryo. *PloS one*. 2010;5(5).
56. Brend T, Gilthorpe J, Summerbell D, Rigby P. Multiple levels of transcriptional and post-transcriptional regulation are required to define the domain of Hoxb4 expression. *Development (Cambridge, England)*. 2003;130(12):2717-2728.
57. Shoji F, Kimi A, Osamu C, Masatake A, Katsumasa T, Ken-ichi Y. Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. *Gene*. 1998;209.
58. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf C, et al. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*. 2011;145(3):383-397.
59. Sharpe J, Nonchev S, Gould A, Whiting J, Krumlauf R. Selectivity, sharing and competitive interactions in the regulation of Hoxb genes. *The EMBO journal*. 1998;17(6):1788-1798.
60. Zákány J, Kmita M, Alarcon P, de la Pompa J, Duboule D. Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. *Cell*. 2001;106(2):207-217.
61. Lawrence H, Sauvageau G, Ahmadi N, et al. Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Experimental*

hematology. 1995;23(11):1160-1166.

62. Sauvageau G, Lansdorp P, Eaves C, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(25):12223-12227.

63. Sauvageau G, Lansdorp... P. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the ...* 1994.

64. Ekker S, Jackson D, von Kessler D, Sun B, Young K, Beachy P. The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *The EMBO journal*. 1994;13(15):3551-3560.

65. Mukherjee K, Bürglin T. Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution. *Journal of molecular evolution*. 2007;65(2):137-153.

66. Bürglin T, Ruvkun G. New motif in PBX genes. *Nature genetics*. 1992;1(5):319-320.

67. Steelman S, Moskow JJ, Muzynski K, et al. Identification of a conserved family of Meis1-related homeobox genes. *Genome Research*. 1997;7.

68. Gomez-Skarmeta J, Diez del Corral R, de la Calle-Mustienes E, Ferré-Marcó D, Modolell J. Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell*. 1996;85(1):95-105.

69. Piper D, Batchelor A, Chang C, Cleary M, Wolberger C. Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell*. 1999;96(4):587-597.

70. Berger M, Badis G, Gehrke A, et al. Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. *Cell*. 2008;133(7):1266-1276.

71. Knoepfler P, Calvo K, Chen H, Antonarakis S, Kamps M. Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14553-14558.

72. Carroll A, Crist W, Parmley R, Roper M, Cooper M, Finley W. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*. 1984;63(3):721-724.

73. Williams D, Look A, Melvin S, et al. New chromosomal translocations corre-

late with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell*. 1984;36(1):101-109.

74. Nourse J, Mellentin J, Galili N, et al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell*. 1990;60(4):535-545.

75. Kamps M, Murre C, Sun X, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell*. 1990;60(4):547-555.

76. Peifer M, Wieschaus E. Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes & development*. 1990;4(7):1209-1223.

77. Wagner K, Mincheva A, Korn B, Lichter P, Pöpperl H. Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mechanisms of development*. 2001;103(1-2):127-131.

78. Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary M. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(12):6149-6157.

79. Sengupta M, Liang S, Potluri HHS, Chang LJ, Morel L. The SLE-associated Pbx1-d isoform acts as a dominant-negative transcriptional regulator. *Genes and immunity*. 2012;13(8):653-657.

80. Milech N, Kees U, Watt P. Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes, chromosomes & cancer*. 2001;32(3):275-280.

81. Kiel M, Yilmaz O, Iwashita T, Yilmaz O, Terhorst C, Morrison S. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-1121.

82. Horman S, Velu C, Chaubey A, et al. Gfi1 integrates progenitor versus granulocytic transcriptional programming. *Blood*. 2009;113(22):5466-5475.

83. Park J, Shih I-M, Wang T-L. Identification of Pbx1, a potential oncogene, as a Notch3 target gene in ovarian cancer. *Cancer research*. 2008;68(21):8852-8860.

84. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N, et al. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene*. 2009;28(49):4364-4374.

85. Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, et al. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene*. 2007;26(3):339-348.
86. LeBrun D, Cleary M. Fusion with E2A alters the transcriptional properties of the homeodomain protein PBX1 in t(1;19) leukemias. *Oncogene*. 1994;9(6):1641-1647.
87. Fognani C, Kilstrup-Nielsen C, Berthelsen J, Ferretti E, Zappavigna V, Blasi F. Characterization of PREP2, a paralog of PREP1, which defines a novel sub-family of the MEINOX TALE homeodomain transcription factors. *Nucleic acids research*. 2002;30(9):2043-2051.
88. Bürglin T. The PBC domain contains a MEINOX domain: coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Development genes and evolution*. 1998;208(2):113-116.
89. Moskow J, Bullrich F, Huebner K, Daar I, Buchberg A. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(10):5434-5443.
90. Nakamura T, Jenkins N, Copeland N. Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes. *Oncogene*. 1996;13(10):2235-2242.
91. Rieckhof G, Casares F, Ryoo H, Abu-Shaar M, Mann R. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*. 1997;91(2):171-183.
92. Esparza S, Chang J, Shankar D, Zhang B, Nelson S, Sakamoto K. CREB regulates Meis1 expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*. 2008;22(3):665-667.
93. Xiang P, Lo C, Argiropoulos B, et al. Identification of E74-like factor 1 (ELF1) as a transcriptional regulator of the Hox cofactor MEIS1. *Experimental hematology*. 2010;38(9):798.
94. Yamada T, Urano-Tashiro Y, Tanaka S, Akiyama H, Tashiro F. Involvement of cross-talk between Oct4 and Meis1a in neural cell fate decision. *PloS one*. 2013;8(2).
95. Calvo K, Sykes D, Pasillas M, Kamps M. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene*. 2002;21(27):4247-4256.
96. Dihal A, Boot A, van Roon E, et al. The homeobox gene MEIS1 is methylated in BRAF (p.V600E) mutated colon tumors. *PloS one*. 2013;8(11).
97. Bell A, Bell D, Weber R, El-Naggar A. CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer*. 2011;117(13):2898-2909.

98. Rauch T, Wang Z, Wu X, Kernstine K, Riggs A, Pfeifer G. DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(2):287-296.
99. Laursen K, Mongan N, Zhuang Y, Ng M, Benoit Y, Gudas L. Polycomb recruitment attenuates retinoic acid-induced transcription of the bivalent NR2F1 gene. *Nucleic acids research*. 2013;41(13):6430-6443.
100. Milne T, Martin M, Brock H, Slany R, Hess J. Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer research*. 2005;65(24):11367-11374.
101. Kashyap V, Laursen K, Brenet F, Viale A, Scandura J, Gudas L. RAR γ is essential for retinoic acid induced chromatin remodeling and transcriptional activation in embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 4):999-1008.
102. Xiang P, Wei W, Lo C, et al. Delineating MEIS1 cis-regulatory elements active in hematopoietic cells. *Leukemia*. 2013.
103. Wang Q, Li Y, Dong J, et al. Regulation of MEIS1 by distal enhancer elements in acute leukemia. *Leukemia*. 2014;28(1):138-146.
104. Royo J, Bessa J, Hidalgo C, et al. Identification and analysis of conserved cis-regulatory regions of the MEIS1 gene. *PloS one*. 2012;7(3).
105. Crist R, Roth J, Waldman S, Buchberg A. A conserved tissue-specific homeodomain-less isoform of MEIS1 is downregulated in colorectal cancer. *PloS one*. 2011;6(8).
106. Huang H, Rastegar M, Bodner C, Goh S-L, Rambaldi I, Featherstone M. MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10119-10127.
107. Chen H, Rossier C, Nakamura Y, Lynn A, Chakravarti A, Antonarakis S. Cloning of a novel homeobox-containing gene, PKNOX1, and mapping to human chromosome 21q22.3. *Genomics*. 1997;41(2):193-200.
108. Fuller J, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, Fraser J, Gasson J. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. *Blood*. 1999;93(10):3391-3400.
109. So C, Karsunky H, Wong P, Weissman I, Cleary M. Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood*. 2004;103(8):3192-3199.

110. Shimamoto T, Tang Y, Naot Y, et al. Hematopoietic progenitor cell abnormalities in Hoxc-8 null mutant mice. *The Journal of experimental zoology*. 1999;283(2):186-193.
111. Shen W, Detmer K, Mathews C, et al. Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *The EMBO journal*. 1992;11(3):983-989.
112. Brun A, Björnsson J, Magnusson M, et al. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004;103(11):4126-4133.
113. Ko K-H, Lam Q, Zhang M, et al. Hoxb3 deficiency impairs B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Experimental hematology*. 2007;35(3):465-475.
114. Björnsson J, Larsson N, Brun A, et al. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(11):3872-3883.
115. Antonio D, Marina P, Maria Cristina C, Giovanna P, Francesco F, Giorgio C. The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34+ cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors. *Experimental Hematology*. 2000;28.
116. Izon D, Rozenfeld S, Fong S, Kömüves L, Largman C, Lawrence H. Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood*. 1998;92(2):383-393.
117. Lawrence H, Helgason C, Sauvageau G, et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood*. 1997;89(6):1922-1930.
118. Lawrence H, Christensen J, Fong S, et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2005;106(12):3988-3994.
119. Lebert-Ghali C-E, Fournier M, Dickson G, Thompson A, Sauvageau G, Bijl J. HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental hematology*. 2010;38(11):1074.
120. Selleri L, Depew M, Jacobs Y, et al. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*. 2001;128(18):3543-3557.
121. Manley N, Selleri L, Brendolan A, Gordon J, Cleary M. Abnormalities of caudal pha-

- ryngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs. *Developmental biology*. 2004;276(2):301-312.
122. Lee J, Zhang A, Gu X, Jacobs Y, Cleary M. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in Ipf1-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nature ...* 2002.
123. Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, et al. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(13):3113-3126.
124. Schnabel C, Selleri L, Jacobs Y, Warnke R, Cleary M. Expression of Pbx1b during mammalian organogenesis. *Mechanisms of development*. 2001;100(1):131-135.
125. Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, et al. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*. 1999;402(6760):425-429.
126. DiMartino J, Selleri L, Traver D, et al. The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood*. 2001;98(3):618-626.
127. Ficara F, Murphy M, Lin M, Cleary M. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell stem cell*. 2008;2(5):484-496.
128. Sanyal M, Tung J, Karsunky H, et al. B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. *Blood*. 2007;109(10):4191-4199.
129. Selleri L, DiMartino J, van Deursen J, et al. The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(12):5324-5331.
130. Capellini T, Di Giacomo G, Salsi V, et al. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development (Cambridge, England)*. 2006;133(11):2263-2273.
131. Di Giacomo G, Koss M, Capellini T, Brendolan A, Pöpperl H, Selleri L. Spatio-temporal expression of Pbx3 during mouse organogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. 2006;6(7):747-757.
132. Rhee J, Arata A, Selleri L, et al. Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *The American journal of pathology*. 2004;165(4):1343-1350.
133. Hisa T, Spence S, Rachel R, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *The EMBO journal*. 2004;23(2):450-459.
134. Azcoitia V, Aracil M, Martínez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is

essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Developmental biology*. 2005;280(2):307-320.

135. Kocabas F, Zheng J, Thet S, et al. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2012;120(25):4963-4972.

136. Unnisa Z, Clark J, Roychoudhury J, et al. Meis1 preserves hematopoietic stem cells in mice by limiting oxidative stress. *Blood*. 2012;120(25):4973-4981.

137. Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, et al. Homeodomain transcription factor meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PloS one*. 2014;9(2).

138. Cai M, Langer E, Gill J, et al. Dual actions of Meis1 inhibit erythroid progenitor development and sustain general hematopoietic cell proliferation. *Blood*. 2012;120(2):335-346.

139. Okada Y, Matsuura E, Nagai R, et al. PREP1, MEIS1 homolog protein, regulates PF4 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;305(1):155-159.

140. Okada Y, Nagai R, Sato T, et al. Homeodomain proteins MEIS1 and PBXs regulate the lineage-specific transcription of the platelet factor 4 gene. *Blood*. 2003;101(12):4748-4756.

141. Carramolino L, Fuentes J, García-Andrés C, Azcoitia V, Riethmacher D, Torres M. Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circulation research*. 2010;106(7):1197-1201.

142. Fernandez-Diaz L, Laurent A, Girasoli S, et al. The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. *Development (Cambridge, England)*. 2010;137(20):3393-3403.

143. Ferretti E, Villaescusa J, Di Rosa P, et al. Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(15):5650-5662.

144. Murphy M, Polok B, Schorderet D, Cleary M. Essential role for Pbx1 in corneal morphogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(2):795-803.

145. Di Rosa P, Villaescusa J, Longobardi E, et al. The homeodomain transcription factor Prep1 (pKnox1) is required for hematopoietic stem and progenitor cell activity. *Developmental biology*. 2007;311(2):324-334.

146. Iotti G, Mejetta S, Modica L, Penkov D, Ponzoni M, Blasi F. Reduction of Prep1 levels affects differentiation of normal and malignant B cells and accelerates Myc driven lym-

phomagenesis. *PloS one*. 2012;7(10).

147. Penkov D, Di Rosa P, Fernandez Diaz L, et al. Involvement of Prep1 in the alphabeta T-cell receptor T-lymphocytic potential of hematopoietic precursors. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(24):10768-10781.

148. Golub T, Slonim D, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, NY)*. 1999;286(5439):531-537.

149. Dickson G, Liberante F, Kettyle L, et al. HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(8):1216-1225.

150. Li Z, Huang H, Li Y, et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood*. 2012;119(10):2314-2324.

151. Armstrong S, Look A. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(26):6306-6315.

152. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*. 2003;102(7):2395-2402.

153. Basecke J, Whelan J, Griesinger F, Bertrand F. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 2006;135(4):438-449.

154. Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, et al. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood*. 2004;103(1):229-235.

155. Yu B, Hess J, Horning S, Brown G, Korsmeyer S. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*. 1995;378(6556):505-508.

156. Yu B, Hanson R, Hess J, Horning S, Korsmeyer S. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(18):10632-10636.

157. Brock H, van Lohuizen M. The Polycomb group--no longer an exclusive club? *Cur-*

rent opinion in genetics & development. 2001;11(2):175-181.

158. Jude C, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher J, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell stem cell*. 2007;1(3):324-337.

159. McMahon K, Hiew S, Hadjur S, et al. Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell stem cell*. 2007;1(3):338-345.

160. Hsieh J, Cheng E, Korsmeyer S. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell*. 2003;115(3):293-303.

161. Zeleznik-Le N, Harden A, Rowley J. 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(22):10610-10614.

162. Kooistra S, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(5):297-311.

163. Birke M, Schreiner S, García-Cuéllar M-P, Mahr K, Titgemeyer F, Slany R. The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic acids research*. 2002;30(4):958-965.

164. Yokoyama A, Cleary M. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer cell*. 2008;14(1):36-46.

165. Milne T, Briggs S, Brock H, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular cell*. 2002;10(5):1107-1117.

166. Dou Y, Milne T, Tackett A, et al. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*. 2005;121(6):873-885.

167. Ruthenburg A, Wang W, Graybosch D, et al. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(8):704-712.

168. Schuetz A, Allali-Hassani A, Martín F, et al. Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *The EMBO journal*. 2006;25(18):4245-4252.

169. Southall S, Wong P-S, Odho Z, Roe S, Wilson J. Structural basis for the requirement of additional factors for MLL1 SET domain activity and recognition of epigenetic marks. *Molecular cell*. 2009;33(2):181-191.

170. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009;23(8):1490-1499.
171. Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, et al. The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. *Blood*. 2009;113(17):4011-4015.
172. Mueller D, Bach C, Zeisig D, et al. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood*. 2007;110(13):4445-4454.
173. Bitoun E, Oliver P, Davies K. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Human molecular genetics*. 2007;16(1):92-106.
174. Deshpande A, Bradner J, Armstrong S. Chromatin modifications as therapeutic targets in MLL-rearranged leukemia. *Trends in immunology*. 2012;33(11):563-570.
175. Nie Z, Yan Z, Chen E, et al. Novel SWI/SNF chromatin-remodeling complexes contain a mixed-lineage leukemia chromosomal translocation partner. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(8):2942-2952.
176. Lavau C, Du C, Thirman M, Zeleznik-Le N. Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *The EMBO journal*. 2000;19(17):4655-4664.
177. Cheung N, Chan L, Thompson A, Cleary M, So C. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nature cell biology*. 2007;9(10):1208-1215.
178. Dobson C, Warren A, Pannell R, Forster A, Rabbitts T. Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *The EMBO journal*. 2000;19(5):843-851.
179. Linder B, Newman R, Jones L, et al. Biochemical analyses of the AF10 protein: the extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation. *Journal of molecular biology*. 2000;299(2):369-378.
180. Huang H, Jiang X, Li Z, et al. TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(29):11994-11999.
181. Milne T, Kim J, Wang G, et al. Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis. *Molecular cell*. 2010;38(6):853-863.
182. Kalverda B, Pickersgill H, Shloma V, Fornerod M. Nucleoporins directly stimu-

late expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell*. 2010;140(3):360-371.

183. Wang G, Cai L, Pasillas M, Kamps M. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nature cell biology*. 2007;9(7):804-812.

184. Wang G, Song J, Wang Z, et al. Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*. 2009;459(7248):847-851.

185. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008;111(9):4668-4680.

186. Tamba SD, Glenn AG, Mark OJO. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*. 1989;28.

187. Maggi L, Kuchenruether M, Dadey D, et al. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(23):7050-7065.

188. Yun J-P, Chew E, Liew C-T, et al. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90(6):1140-1148.

189. Swaminathan V, Kishore A, Febitha K, Kundu T. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(17):7534-7545.

190. Okuda M, Horn H, Tarapore P, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 2000;103(1):127-140.

191. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman A, Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer research*. 2010;70(17):6746-6756.

192. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*. 2005;437(7055):147-153.

193. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine*. 2005;352(3):254-266.

194. Nakagawa M, Kameoka Y, Suzuki R. Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;352(17):1819.

195. Grummitt C, Townsley F, Johnson C, Warren A, Bycroft M. Structural consequences

of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(34):23326-23332.

196. Mullighan C, Kennedy A, Zhou X, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia*. 2007;21(9):2000-2009.

197. Gurumurthy M, Tan C, Ng R, et al. Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. *Journal of molecular biology*. 2008;378(2):302-317.

198. Chao S-H, Walker J, Chanda S, Gray N, Caldwell J. Identification of homeodomain proteins, PBX1 and PREP1, involved in the transcription of murine leukemia virus. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(3):831-841.

199. Chen L, Deshpande A, Banka D, et al. Abrogation of MLL-AF10 and CALM-AF10-mediated transformation through genetic inactivation or pharmacological inhibition of the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Leukemia*. 2013;27(4):813-822.

200. Camós M, Esteve J, Jares P, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer research*. 2006;66(14):6947-6954.

201. Dufour A, Schneider F, Metzeler K, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):570-577.

202. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(5):394-400.

203. Lutterbach B, Westendorf J, Linggi... B. ETO, a target of t (8; 21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. ... *and cellular biology*. 1998.

204. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(1):224-234.

205. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough M, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(1):495-505.

206. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough M, et al. Overexpression of HOXB3 in he-

matopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity*. 1997;6(1):13-22.

207. Fischbach N, Rozenfeld S, Shen W, 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;105(4):1456-1466.

208. Perkins A, Cory S. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *The EMBO journal*. 1993;12(10):3835-3846.

209. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves C, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & development*. 1995;9(14):1753-1765.

210. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg A, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO journal*. 1998;17(13):3714-3725.

211. Breitinger C, Maethner E, Garcia-Cuellar M-P, Slany R. The homeodomain region controls the phenotype of HOX-induced murine leukemia. *Blood*. 2012;120(19):4018-4027.

212. Cellot S, Kros J, Chagraoui J, Meloche S, Humphries R, Sauvageau G. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Experimental hematology*. 2007;35(5):802-816.

213. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*. 2002;99(1):121-129.

214. Bach C, Buhl S, Mueller D, García-Cuellar M-P, Maethner E, Slany R. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood*. 2010;115(14):2910-2918.

215. Nakamura T, Largaespada D, Shaughnessy J, Jenkins N, Copeland N. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature genetics*. 1996;12(2):149-153.

216. Calvo K, Knoepfler P, Sykes D, Pasillas M, Kamps M. Meis1a suppresses differentiation by G-CSF and promotes proliferation by SCF: potential mechanisms of cooperativity with Hoxa9 in myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(23):13120-13125.

217. Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada D, et al. Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Experimental hematology*. 2001;29(7):856-863.
218. Kee B, Quong M, Murre C. E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunological reviews*. 2000;175:138-149.
219. Denis C, Chitayat S, Plevin M, et al. Structural basis of CBP/p300 recruitment in leukemia induction by E2A-PBX1. *Blood*. 2012;120(19):3968-3977.
220. Aspland S, Bendall H, Murre C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*. 2001;20(40):5708-5717.
221. Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO journal*. 2001;20(3):350-361.
222. Pineault N, Buske C, Feuring-Buske M, et al. Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood*. 2003;101(11):4529-4538.
223. Iwasaki M, Kuwata T, Yamazaki Y, et al. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood*. 2005;105(2):784-793.
224. Lin Y-W, Slape C, Zhang Z, Aplan P. NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood*. 2005;106(1):287-295.
225. Pineault N, Abramovich C, Humphries R. Transplantable cell lines generated with NUP98-Hox fusion genes undergo leukemic progression by Meis1 independent of its binding to DNA. *Leukemia*. 2005;19(4):636-643.
226. Barbouti A, Höglund M, Johansson B, et al. A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a result of the cryptic t(7;17)(p15;q23). *Cancer research*. 2003;63(6):1202-1206.
227. Hope K, Cellot S, Ting S, et al. An RNAi screen identifies Msi2 and Prox1 as having opposite roles in the regulation of hematopoietic stem cell activity. *Cell stem cell*. 2010;7(1):101-113.
228. Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N, et al. A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell

- acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*. 2005;19(3):358-366.
229. Ayton P, Cleary M. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & development*. 2003;17(18):2298-2307.
230. Kumar A, Hudson W, Chen W, Nishiuchi R, Yao Q, Kersey J. Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood*. 2004;103(5):1823-1828.
231. Wong P, Iwasaki M, Somervaille T, So C, So C, Cleary M. Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes & development*. 2007;21(21):2762-2774.
232. Woolthuis C, Han L, Verkaik-Schakel R, et al. Downregulation of MEIS1 impairs long-term expansion of CD34+ NPM1-mutated acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(4):848-853.
233. Kros J, Baban S, Kros G, Rozenfeld S, Largman C, Sauvageau G. Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene*. 1998;16(26):3403-3412.
234. Schnabel C, Jacobs Y, Cleary M. HoxA9-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbx and Meis. *Oncogene*. 2000;19(5):608-616.
235. Li Z, Zhang Z, Li Y, et al. PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. *Blood*. 2013;121(8):1422-1431.
236. Micali N, Longobardi E, Iotti G, et al. Down syndrome fibroblasts and mouse Prep1-overexpressing cells display increased sensitivity to genotoxic stress. *Nucleic acids research*. 2010;38(11):3595-3604.
237. Iotti G, Longobardi E, Masella S, et al. Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):22.
238. Longobardi E, Iotti G, Di Rosa P, et al. Prep1 (pKnox1)-deficiency leads to spontaneous tumor development in mice and accelerates EmuMyc lymphomagenesis: a tumor suppressor role for Prep1. *Molecular oncology*. 2010;4(2):126-134.
239. Wang G, Pasillas M, Kamps M. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood*. 2005;106(1):254-264.

240. Hess J, Bittner C, Zeisig D, et al. c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood*. 2006;108(1):297-304.
241. Argiropoulos B, Yung E, Xiang P, et al. Linkage of the potent leukemogenic activity of Meis1 to cell-cycle entry and transcriptional regulation of cyclin D3. *Blood*. 2010;115(20):4071-4082.
242. Ramsey J, Kettyle L, Sharpe D, et al. Entinostat prevents leukemia maintenance in a collaborating oncogene-dependent model of cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2013;31(7):1434-1445.
243. Chan S, Jaffe L, Capovilla M, Botas J, Mann R. The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell*. 1994;78(4):603-615.
244. van Dijk M, Murre C. extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell*. 1994;78(4):617-624.
245. van Dijk M, Peltenburg L, Murre C. Hox gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2. *Mechanisms of development*. 1995;52(1):99-108.
246. Chang C, Shen W, Rozenfeld S, Lawrence H, Largman C, Cleary M. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes & development*. 1995;9(6):663-674.
247. Phelan M, Rambaldi I, Featherstone M. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(8):3989-3997.
248. Lu Q, Knoepfler P, Scheele J, Wright D, Kamps M. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(7):3786-3795.
249. Neuteboom S, Peltenburg L, van Dijk M, Murre C. The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(20):9166-9170.
250. Neuteboom S, Murre C. Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(8):4696-4706.
251. Chang C, Brocchieri L, Shen W, Largman C, Cleary M. Pbx modulation of Hox home-

- odomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(4):1734-1745.
252. LaRonde-LeBlanc N, Wolberger C. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes & development*. 2003;17(16):2060-2072.
253. Shen W, Montgomery J, Rozenfeld S, et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(11):6448-6458.
254. Shanmugam K, Green N, Rambaldi I, Saragovi H, Featherstone M. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(11):7577-7588.
255. Berthelsen J, Zappavigna V, Ferretti E, Mavilio F, Blasi F. The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *The EMBO journal*. 1998;17(5):1434-1445.
256. Chang C, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins N, Copeland N, Cleary M. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(10):5679-5687.
257. Berthelsen J, Zappavigna V, Mavilio F, Blasi F. Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *The EMBO journal*. 1998;17(5):1423-1433.
258. Shen W, Rozenfeld S, Kwong A, Köm ves L, Lawrence H, Largman C. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(4):3051-3061.
259. Jacobs Y, Schnabel C, Cleary M. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(7):5134-5142.
260. Calvo K, Knoepfler P, McGrath S, Kamps M. An inhibitory switch derepressed by pbx, hox, and Meis/Prep1 partners regulates DNA-binding by pbx1 and E2a-pbx1 and is dispensable for myeloid immortalization by E2a-pbx1. *Oncogene*. 1999;18(56):8033-8043.
261. Saleh M, Rambaldi I, Yang X, Featherstone M. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(22):8623-8633.
262. Rauskolb C, Smith K, Peifer M, Wieschaus E. extradenticle determines segmen-

- tal identities throughout *Drosophila* development. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121(11):3663-3673.
263. González-Crespo S, Abu-Shaar M, Torres M, Martínez-A C, Mann R, Morata G. Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature*. 1998;394(6689):196-200.
264. Mercader N, Tanaka E, Torres M. Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(18):4131-4142.
265. Saleh M, Huang H, Green N, Featherstone M. A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Experimental cell research*. 2000;260(1):105-115.
266. Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes & development*. 1999;13(8):946-953.
267. Kilstrup-Nielsen C, Alessio M, Zappavigna V. PBX1 nuclear export is regulated independently of PBX-MEINOX interaction by PKA phosphorylation of the PBC-B domain. *The EMBO journal*. 2003;22(1):89-99.
268. Huang H, Paliouras M, Rambaldi I, Lasko P, Featherstone M. Nonmuscle myosin promotes cytoplasmic localization of PBX. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(10):3636-3645.
269. Berkes C, Bergstrom D, Penn B, Seaver K, Knoepfler P, Tapscott S. Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Molecular cell*. 2004;14(4):465-477.
270. Choe S-K, Ladam F, Sagerström C. TALE Factors Poise Promoters for Activation by Hox Proteins. *Developmental cell*. 2014;28(2):203-211.
271. Asahara H, Dutta S, Kao H, Evans R, Montminy M. Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(12):8219-8225.
272. Wang Z, Iwasaki M, Ficara F, et al. GSK-3 promotes conditional association of CREB and its coactivators with MEIS1 to facilitate HOX-mediated transcription and oncogenesis. *Cancer cell*. 2010;17(6):597-608.
273. Goh S-L, Looi Y, Shen H, et al. Transcriptional activation by MEIS1A in response to

protein kinase A signaling requires the transducers of regulated CREB family of CREB co-activators. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(28):18904-18912.

274. Choe S-K, Lu P, Nakamura M, Lee J, Sagerström C. Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis. *Developmental cell*. 2009;17(4):561-567.

275. Agoston Z, Heine P, Brill M, et al. Meis2 is a Pax6 co-factor in neurogenesis and dopaminergic periglomerular fate specification in the adult olfactory bulb. *Development (Cambridge, England)*. 2014;141(1):28-38.

276. Mikkola I, Bruun J, Holm T, Johansen T. Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(6):4109-4118.

277. Liu Y, MacDonald R, Swift G. DNA binding and transcriptional activation by a PDX1. PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(21):17985-17993.

278. Rave-Harel N, Givens M, Nelson S, et al. TALE homeodomain proteins regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression independently and via interactions with Oct-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(29):30287-30297.

279. Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood*. 2012;119(2):388-398.

280. Yamada T, Shimizu T, Sakurai T, et al. Physical and functional interactions between hematopoietic cell-specific ETS transcription factors and homeodomain proteins. *Leukemia research*. 2009;33(3):483-489.

281. Peng H, Slattery M, Mann R. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes & development*. 2009;23(19):2307-2319.

282. Bailey J, Rave-Harel N, McGillivray S, Coss D, Mellon P. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2004;18(5):1158-1170.

283. Steinberg X, Hepp M, Fernández García Y, et al. Human CCAAT/enhancer-binding protein β interacts with chromatin remodeling complexes of the imitation switch subfamily. *Biochemistry*. 2012;51(5):952-962.

284. Ku W-C, Chiu S-K, Chen Y-J, Huang H-H, Wu W-G, Chen Y-J. Complementary quantitative proteomics reveals that transcription factor AP-4 mediates E-box-dependent complex formation for transcriptional repression of HDM2. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(9):2034-2050.
285. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci C, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*. 2010;140(5):744-752.
286. Agoston Z, Schulte D. Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development (Cambridge, England)*. 2009;136(19):3311-3322.
287. Bischof L, Kagawa N, Moskow J, et al. Members of the meis1 and pbx homeodomain protein families cooperatively bind a cAMP-responsive sequence (CRS1) from bovine CYP17. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(14):7941-7948.
288. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell stem cell*. 2010;7(3):380-390.
289. Ferretti E, Marshall H, Pöpperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F. Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(1):155-166.
290. Mojsin M, Stevanovic M. PBX1 and MEIS1 up-regulate SOX3 gene expression by direct interaction with a consensus binding site within the basal promoter region. *The Biochemical journal*. 2010;425(1):107-116.
291. Argiropoulos B, Palmqvist L, Yung E, et al. Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3. *Experimental hematology*. 2008;36(7):845-859.
292. Morgado E, Albouhair S, Lavau C. Flt3 is dispensable to the Hoxa9/Meis1 leukemogenic cooperation. *Blood*. 2007;109(9):4020-4022.
293. Wilson N, Foster S, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell stem cell*. 2010;7(4):532-544.
294. Penkov D, Mateos San Martín D, Fernandez-Díaz L, et al. Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell reports*. 2013;3(4):1321-1333.

295. Mamo A, Krosi J, Kroon E, et al. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood*. 2006;108(2):622-629.
296. Wang G, Pasillas M, Kamps M. Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(10):3902-3916.
297. Pakhomov A, Martynov V. GFP family: structural insights into spectral tuning. *Chemistry & biology*. 2008;15(8):755-764.
298. Frank HJ, Osamu S, Yo S, Lewis CG, George TR, John RW. Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962;60.
299. Wilson T, Hastings J. Bioluminescence. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14:197-230.
300. Xu Y, Piston D, Johnson C. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(1):151-156.
301. Angers S, Salahpour A, Joly E, et al. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3684-3689.
302. Héroux M, Hogue M, Lemieux S, Bouvier M. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(43):31610-31620.
303. Audet M, Lagacé M, Silversides D, Bouvier M. Protein-protein interactions monitored in cells from transgenic mice using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(8):2829-2838.
304. Jiang L, Collins J, Davis R, et al. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(14):10576-10584.

305. Mazars A, Fåhraeus R. Using BRET to study chemical compound-induced disruptions of the p53-HDM2 interactions in live cells. *Biotechnology journal*. 2010;5(4):377-384.
306. Hamdan F, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *Journal of biomolecular screening*. 2005;10(5):463-475.
307. Dardaei L, Longobardi E, Blasi F. Prep1 and Meis1 competition for Pbx1 binding regulates protein stability and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(10):905.
308. Grandori C, Cowley S, James L, Eisenman R. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*. 2000;16:653-699.
309. Lavoie H, Thevakumaran N, Gavory G, et al. Inhibitors that stabilize a closed RAF kinase domain conformation induce dimerization. *Nature chemical biology*. 2013;9(7):428-436.
310. Morgan R, Pirard P, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha H. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer research*. 2007;67(12):5806-5813.
311. Morgan R, Boxall A, Harrington K, Simpson G, Michael A, Pandha H. Targeting HOX transcription factors in prostate cancer. *BMC urology*. 2014;14:17.
312. Morgan R, Boxall A, Harrington K, et al. Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;136(2):389-398.
313. Morgan R, Plowright L, Harrington K, Michael A, Pandha H. Targeting HOX and PBX transcription factors in ovarian cancer. *BMC cancer*. 2010;10:89.
314. Plowright L, Harrington K, Pandha H, Morgan R. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). *British journal of cancer*. 2009;100(3):470-475.
315. Mulgrew N, Kettle L, Ramsey J, et al. c-Met inhibition in a HOXA9/Meis1 model of CN-AML. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2014;243(1):172-181.
316. Lehnertz B, Pabst C, Su L, et al. The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML. *Genes & development*. 2014;28(4):317-327.

317. Costa B, Smith J, Chen Y, et al. Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer research*. 2010;70(2):453-462.
318. Mahmoud A, Kocabas F, Muralidhar S, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013;497(7448):249-253.
319. Stankunas K, Shang C, Twu K, et al. Pbx/Meis deficiencies demonstrate multigenetic origins of congenital heart disease. *Circulation research*. 2008;103(7):702-709.
320. Longobardi E, Blasi F. Overexpression of PREP-1 in F9 teratocarcinoma cells leads to a functionally relevant increase of PBX-2 by preventing its degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(40):39235-39241.
321. Spruijt C, Gnerlich F, Smits A, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*. 2013;152(5):1146-1159.
322. Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson S, Mann M, Kouzarides T. Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*. 2010;143(3):470-484.
323. Maciejewski J, Padgett R. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *British journal of haematology*. 2012;158(2):165-173.
324. Schoofs T, Berdel W, Müller-Tidow C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(1):1-14.