

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

## **Die Rolle der Helikase HELLS in der Pathogenese der pädiatrischen cALL**

Stephanie Bettina Irene Margarete Seidelmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach  
2. Priv.-Doz. Dr. I. Teichert- von Lüttichau

Die Dissertation wurde am 13.03.2014 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2014  
angenommen.

Für Julia, die mir eine wunderbare Freundin war.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Reifung der B-Zellen	- 1 -
1.2 Pathogenese der cALL	- 3 -
1.2.1 Chromosomale Abberationen	- 3 -
1.2.1.1 Hyperdiploidie, Triple-Trisomien und Hypodiploidie	- 3 -
1.2.1.2 Translokationen	- 4 -
1.2.2 Mutationen in Differenzierungsgenen	- 5 -
1.2.3 Epigenetik	- 7 -
1.2.3.1 Epigenetische Mechanismen	- 7 -
1.2.3.2 Fehlregulationen in Tumorzellen	- 8 -
1.3 HELLS (Helikase, lymphozytenspezifisch)	- 9 -
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	- 14 -
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>- 16 -</b>
2.1 Material	- 16 -
2.1.1 Kulturzellen	- 16 -
2.1.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur	- 16 -
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	- 16 -
2.1.4 Small interfering RNAs und Vektoren	- 17 -
2.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Antikörper	- 18 -
2.1.6 Primer-Assays	- 20 -
2.1.7 Arrays	- 20 -
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	- 20 -
2.1.9 Geräte	- 21 -
2.2 Methoden	- 22 -
2.2.1 Zellkultur mit Suspensionszellen	- 22 -
2.2.2 Zellzählung und Vitalitätsmessung	- 23 -
2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	- 23 -
2.2.4 RNA-Isolierung	- 24 -
2.2.4.1 Quiagen-Methode	- 24 -
2.2.4.2 Trizol-Methode	- 24 -
2.2.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung	- 25 -
2.2.4.4 Qualitätsbestimmung der RNA	- 25 -

2.2.5	cDNA-Synthese	- 26 -
2.2.6	qRT-PCR	- 27 -
2.2.7	RNA-Interferenz	- 28 -
2.2.8	Elektroporation mit siRNA	- 29 -
2.2.9	pSIREN-Vektorsystem	- 29 -
2.2.10	Methylzellulose-Assay	- 31 -
2.2.11	Durchflusszytometrie	- 32 -
2.2.12	SDS-Polycrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli 1970)	- 34 -
2.2.13	Western-Blot (nach Towbin 1979)	- 35 -
2.2.14	Immunfluoreszenz	- 37 -
2.2.15	Microarray-Analyse	- 38 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 41 -</b>
3.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen der Zelllinien 697 und Nalm6	- 41 -
3.2	HELLS beeinflusst Apoptose nicht	- 43 -
3.3	Überexpression von HELLS hemmt kontaktunabhängiges Wachstum	- 44 -
3.4	HELLS beeinflusst die H3-Acetylierung nicht	- 46 -
3.5	HELLS beeinflusst die H3K4-Trimethylierung nicht	- 49 -
3.6	HELLS fördert die H3K9-Trimethylierung	- 50 -
3.6.1	Western-Blot	- 50 -
3.6.2	qRT-PCR	- 51 -
3.6.3	Immunfluoreszenz	- 52 -
3.7	HELLS beeinflusst die H3K27-Trimethylierung möglicherweise über die Regulation von EZH2	- 53 -
3.8	HELLS hemmt Differenzierung	- 58 -
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>- 60 -</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>- 77 -</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>- 80 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD: 7-Amino-Actinomycin

AG: Arbeitsgruppe

Ago2: Argonaute 2

ALL: akute lymphoblastische Leukämie

APC: Allophycocyanin

APS: Ammoniumpersulfat

AUL: akute undifferenzierte Leukämie

bHLH-Protein: *basic helix loop helix*-Protein

BRCA1: *breast cancer 1*

BSAP: B-Zell-spezifisches-Aktivatorprotein

cALL: *common ALL*

CD: *cluster of differentiation*

CDK6: *cyklin dependent kinase 6*

CLP: *common lymphoid progenitor*

CMP: *common myeloid progenitor*

DAPI: 4'-6-Diamidin-2-phenylindol

DEPC: Diethylidicarbonat

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DNMT: DNA-Methyltransferase

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

dsRNA: Doppelstrang-RNA

E2A<sup>-/-</sup>: E2A-Knockout-Mäuse

ECL: Elektrochemilumineszenz

EED: *embryonic ectoderm development protein*

EFS: *event free survival*

ELP: *earliest lymphoid progenitor*

ERV1: *endogenous virus like*

ES: embryonale Stammzellen

ET: Ewing-Tumor

ETP: *early T-lineage progenitor*

EZH2: *enhancer of zeste 2*

FACS: *fluorescence activated cell sorting*

FBS: fetales bovines Serum

FEBp: *purified fetal early B cells*

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

FRET: *fluorescence resonance energy transfer*

GE: *gated events*

H3: Histon 3

H3-Acetyl: Acetylierung des Histon 3

H3K27trime: Trimethylierung des Lysin 27 am Histon 3

H3K4trime: Trimethylierung des Lysin 4 am Histon 3

H3K9trime: Trimethylierung des Lysin 9 am Histon 3

HAT: Histon-Acetylase

HDAC: Histon-Deacetylase

HELLS: Helikase, lymphozytenspezifisch

HSC: pluripotente hämatopoetische Stammzelle

HWZ: Halbwertszeit

IAP: *intracisternal A particle*

IgH: *immunglobulin heavy chain locus*

IgM+: IgM positiv

Ik<sup>-/-</sup>: Ikaros-Knockout

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

LCA: *leukocyte common antigen*

LINE: *long interspread nuclear element*

LSH: *lymphocyte specific helicase*

LTR: *long terminal repeat*

MaLR: *mammalian apparent LTR retrotransposon*

MCA: Methylzellulose-Assay

MEF: murine embryonale Fibroblasten

MES: murine embryonale Stammzellen

miRNA: micro-RNA

MLL: *mixed lineage leukemia*

MPP: multipotente Progenitorzelle

NK-Zelle: natürliche Killerzelle

NLS: *nuclear localization sequence*

PAM: Prädiktionsanalyse

PASG: *proliferation associated SNF2 like gene*

PBS: *phosphate buffered saline*

PCA: *principal component analysis*

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

PE: Phycoerythrin

PFA: Paraformaldehyd

Prä-BCR: prä-B-Zell-Rezeptor

PRC: Polycomb-Repressions-Komplex

PVDF: Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR: Real-Time-quantitative-PCR

Rb: Retinoblastom

RISC: *RNA induced silencing complex*

RNA: Ribonukleinsäure

RNAi: RNA-Interferenz

Rpm: *revolutions per minute*

SAM: Signifikanzanalyse für Microarrays

SAPE: Streptavidin Phycoerythrin

SINE: *short interspread nuclear element*

siRNA: *small interfering RNA*

SMARCA: *SWI/ SNF2 related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 6*

SNF: Sucrose non fermenter

SUZ12: *suppressor of zeste 12*

TE: *total events*

TRBT: *transactivating response RNA binding protein*

TSA: Trichostatin A

VHL: von-Hippel-Lindau



## 1. Einleitung

Die akute lymphoblastische Leukämie ist mit 25 % aller Krebserkrankungen die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Die Inzidenz liegt bei ca. 3,5 / 100.000 Kindern unter 15 Jahren. Zu den immunologischen Hauptformen der ALL gehören:

- B-Vorläufer-Zell-ALL (84 % aller ALL-Formen): dazu zählen die prä-prä-B-ALL, die *common*-ALL (cALL) und die prä-B-ALL
- B-ALL (3 %)
- T-ALL (13 %)
- AUL (unklassifizierbar)
- ALL mit Koexpression myeloischer Marker (Sitzmann, F.C., 2007)

Die im Folgenden beschriebenen Sachverhalte betreffen die *common*-ALL (cALL).

### 1.1 Reifung der B-Zellen

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC), die ein großes Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential besitzen, können sich zu diversen Vorläuferzellen differenzieren. Sobald diese Vorläuferzellen den Tyrosinkinase-Rezeptor Flt3 als Oberflächenmarker exprimieren, besitzen sie nur noch ein begrenztes Differenzierungspotential (Adolfsson, J. et al., 2001; Christensen, J.L. et al., 2001). Aus diesen multipotenten Progenitorzellen (*multipotent progenitors*, MPP) entstehen nun die Vorläuferzellen der Lymphopoese und Erythro-Myelopoese, die frühen lymphoiden Progenitorzellen (*earliest lymphoid progenitors*, ELP) und die allgemeinen myeloiden Progenitorzellen (*common myeloid progenitors*, CMP) (Busslinger, M., 2004). In den ELP beginnt mit der Expression von RAG1 und RAG2 die  $D_H$ - $J_H$ -Rekombination am *immunoglobulin heavy chain locus* (IgH). Aus den ELP können nun im Thymus frühe T-Progenitorzellen (*early T lineage progenitors*, ETP), sowie im Knochenmark allgemeine lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLP) entstehen. Die CLP bringen dabei vier verschiedene Zelltypen hervor: B-Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Wird der B-Zell-Marker B220 (CD45) exprimiert, differenzieren sich die CLP zu CLP-2-Zellen, die durch die

Expression von CD19 den Weg zur B-Zelle einschlagen und im Stadium der frühen pro-B-Zelle die D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>-Rekombination der schweren Ketten-Gene abschließen. Die vollendete Rekombination der V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-Gene in den späten pro-B-Zellen führt zur Oberflächenexpression des Igμ-Proteins, welches einen Teil des prä-B-Zell-Rezeptors (prä-BCR) darstellt. Der prä-BCR-Komplex ist ein wichtiger Checkpoint vor dem Übergang des pro-B- zum prä-B-Stadium. Er besteht zudem u.a. aus Igα + β, einer μH-Kette, stellvertretenden leichten Ketten, λ5 und VP<sub>REB1</sub>. Wird dieser Checkpoint erfolgreich überwunden, beginnt die Zellexpansion und die Differenzierung zu kleinen prä-B-Zellen (CD25-positiv, CD25+), in welchen die Rekombination der Immunglobulin-Leichtketten-Gene V<sub>L</sub>-J<sub>L</sub> beginnt. Erfolgreiche Rekombination führt zur Freisetzung von IgM-positiven (IgM+), unreifen B-Zellen ins periphere Blut, die sich in den peripheren lymphatischen Organen zu reifen B-Zellen entwickeln (Buslinger, M., 2004). Die Pathogenese der cALL beginnt am Übergang der späten pro-B-Zellen zu den prä-B-Zellen. Tabelle 1 zeigt die Expression wichtiger Oberflächenmarker auf den B-Zellen im Verlauf der einzelnen Differenzierungsstadien und deren Verteilung auf den Tumorzellen.

lymphoider Progenitor	frühe pro-B-Zelle	späte pro-B-Zelle	cALL Diagnose	große prä-B-Zelle	kleine prä-B-Zelle	unreife B-Zelle	reife B-Zelle
IL-R7α	IL-R7α	IL-R7α	+/-				
CD45	CD45	CD45	+	CD45	CD45	CD45	CD45
	HLA-DR	HLA-DR	+	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
	CD19	<b>CD19</b>	+	<b>CD19</b>	CD19	CD19	CD19
	CD79a	CD79a	+	CD79a	CD79a	CD79a	CD79a
	CD10	<b>CD10</b>	+	<b>CD10</b>			
		CD24	+/-	CD24	CD24	CD24	CD24
		CD20	+/-	CD20	CD20	CD20	CD20
	TdT	TdT	+/-	TdT			

**Tabelle 1:** Verteilung wichtiger Oberflächenexpressionsmarker im Laufe der B-Zell-Reifung

Jedes Entwicklungsstadium ist durch die Expression charakteristischer Oberflächenantigene gekennzeichnet. Diese Oberflächenantigene gehören größtenteils der Familie der *cluster of differentiation*-Moleküle (CD-Moleküle) an. Der Begriff *cluster of differentiation* bezeichnet eine Gruppe immunphänotypischer

Oberflächenmerkmale. Meist handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedenste Funktionen einnehmen können. Einige CD-Moleküle haben Rezeptor- oder Signalfunktion, während andere eine enzymatische Aktivität besitzen oder eine Rolle bei der interzellulären Kommunikation spielen (Janeway, C., 2008). Neben dem cALL-Marker CD10, der v.a. auf prä-B-cALL-Zellen, aber auch in normalen Geweben (v.a. in der Niere) exprimiert wird, werden auch die Antigene CD19, HLA-DR, CD79a und CD45 obligat von diesen Zellen exprimiert. Dagegen sind HLA-A2 und HLA-ABC, sowie CD20, CD22, CD24, IL7Ra, VPREB1 und TDT nur fakultativ auf diesen Zellen zu finden (Omim-Datenbank: 142800, 107265, 142860, 112205, 151460, 61349, 107266, 600074, 147730, 182160, 146661, 605141, 187410).

### **1.2 Pathogenese der cALL**

Es sind diverse Mechanismen bekannt, die die Entartung zu Leukämiezellen am Übergang der pro- zur prä-B-Zelle erklären. Dazu gehören:

- Chromosomale Abberationen
- Mutationen in Differenzierungsgenen
- Repression von Tumorsuppressorgenen durch epigenetische Mechanismen

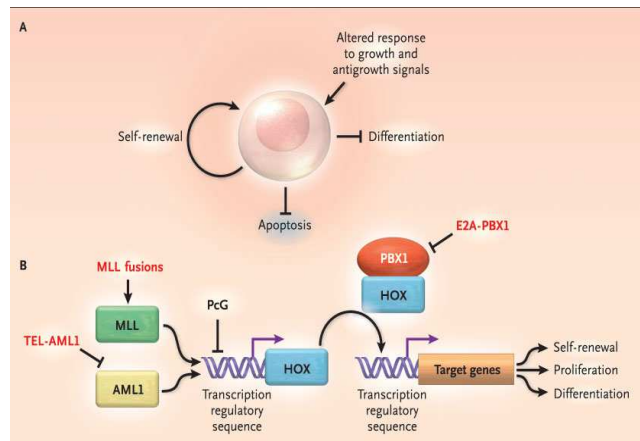
#### **1.2.1 Chromosomale Abberationen**

##### **1.2.1.1 Hyperdiploidie, Triple-Trisomien und Hypodiploidie**

Ein Drittel der Leukämiezellen weist einen hyperdiploiden Genotyp auf. Die Zellen besitzen dabei mehr als 50 Chromosomen. Dieser Subtyp der cALL hat aufgrund hoher Apoptoseraten und einer großen Chemosensibilität eine gute Prognose (*event free survival*, EFS: 75-90 %) (Pui, C.H. et al., 2004; Sitzmann, F.C., 2007). Triple-Trisomien (v.a. der Chromosomen 4, 10 und 17) sind mit einer sehr guten Prognose verbunden. Dagegen sind Hypodiploidien mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert.

### 1.2.1.2 Translokationen

Bei einem weiteren Drittel der cALL-Patienten können Translokationen nachgewiesen werden. Im Folgenden soll nur auf die zwei häufigsten Translokationen näher eingegangen werden. Die mit 25 % häufigste Translokation ist die TEL-AML1-Translokation,  $t(12;21)(p13;q22)$ . TEL gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren und ist wichtig für die Rückkehr (*homing*) der MPP in das Knochenmark. Das AML1-Gen codiert für die  $\alpha$ -Untereinheit des Kernbindungsfaktor-Komplexes CBF $\alpha+\beta$ , der durch die Bindung an eine *core enhanced sequence* (-TGTGGT-) der DNA u.a. zur Rekrutierung von Histon-Acetylasen (HAT) beiträgt und dadurch die Transkription von Genen in Richtung des 3'-Endes (*downstream*) initiiert (u.a. der Hox-Gene). AML1 besitzt somit eine zentrale Rolle in der Hämatopoese (Pui, C.H. et al., 2004). Das TEL-AML1-Fusionsprotein führt durch den Funktionsverlust der  $\alpha$ -Untereinheit des Kernbindungsfaktor-Komplexes CBF $\alpha+\beta$  zur Akquirierung von Histon-Deacetylasen (HDAC) und damit zu einer Inhibition der transkriptionellen Aktivität. Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen betreffen v.a. Prozesse der Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung der HSC (Pui, C.H. et al., 2004). Ähnliche Veränderungen bewirken Translokationen, die das *mixed lineage leukemia*-Gen (MLL) betreffen. Das MLL-Gen liegt auf Chromosom 11 und besitzt eine Methyltransferaseaktivität für das Lysin 4 am Histon 3 (H3K4-Methylierung). Es wurden Translokationen mit über 40 verschiedenen Fusionspartnern beschrieben, welche jeweils den N-Terminus des MLL-Gens und den C-Terminus des Fusionspartners beinhalten. Die häufigsten Fusionen sind die Translokationen  $t(4;11)$ ,  $t(11;19)$  und  $t(9;11)$ . MLL-Fusionsproteine sind ein bedeutender Teil des Hox-Regulationsweges und führen über eine erhöhte H3K4-Methyltransferaseaktivität zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Hox-Genweges (Abbildung 1). Sie bewirken dadurch eine erhöhte Selbsterneuerungs- und Proliferationskapazität der HSC und MPP (Pui, C.H. et al., 2004). MLL-Translokationen sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Pui, C.H. et al., 2004).



**Abbildung 1:** Transformation der hämatopoetischen Zellen in der Pathogenese der ALL (Pui, C.H. et al., 2004)

## 1.2.2 Mutationen in Differenzierungsgenen

Neben chromosomalen Aberrationen stellen Mutationen in Differenzierungsgenen einen weiteren wichtigen Mechanismus in der Entstehung der cALL dar. Wichtige Differenzierungsgene für die Hämatopoese der B-Zellen sind u.a. die Transkriptionsfaktoren Ikaros, PU.1, E2A und das lymphozytenspezifische Protein Pax5 (Busslinger, M., 2004).

Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Ikaros wird v.a. in HSC und MPP exprimiert. Er aktiviert c-kit und Flt3 und ist wichtig für die lymphozytäre Entwicklung durch die Repression myeloischer Gene ( $GM-CSFR\alpha$ ) (Nichogiannopoulou, A. et al., 1999). Die HSC in Ikaros-Knockout-Mäusen ( $Ik^{-/-}$ -Mäuse) besitzen ein 40-fach niedrigeres Selbsterneuerungsvermögen und können keine B- und NK-Zellen generieren. Die Differenzierung zu dendritischen Zellen ist stark reduziert und die T-Lymphopoese anomal. Erklärt werden kann dies dadurch, dass die CLP-Produktion bei stark verminderter Flt3- und c-kit-Expression in  $Ik^{-/-}$ -Mäusen fast erloschen ist, wohingegen die Produktion von ETP beinahe normal bleibt. Durch die aufgehobene Repression von  $GM-CSFR\alpha$  besitzen  $Ik^{-/-}$ -Mäuse zudem eine relative Erhöhung der erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen. Ikaros fungiert desweiteren als epigenetischer Regulator. Durch die Rekrutierung Chromatin-modulierender Komplexe (u.a. SWI/SNF) kann

Ikaros die Zugänglichkeit zur DNA verändern und besitzt damit Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors (Busslinger, M., 2004).

PU.1 (SPI-1) ist ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie und wird v.a. in MPP, nicht aber in Erythroblasten, Megakaryozyten und T-Zellen exprimiert. Er ist essenziell für die Entwicklung von Makrophagen, Osteoklasten, Mastzellen und B-Zellen (Busslinger, M., 2004). PU.1<sup>-/-</sup>-Feten sterben postnatal, weil sie weder myeloide noch lymphoide Zellen generieren können. Megakaryozyten und Erythrozyten können im Gegensatz dazu normal gebildet werden. Zudem weisen PU.1<sup>-/-</sup>-Feten eine stark verminderte Zahl an MPP auf. Retrovirale Experimente (in vitro) konnten zeigen, dass gering exprimiertes PU.1 in den MPP die B-Zell-Entwicklung initiiert, wohingegen eine starke Expression diese unterdrückt und stattdessen die Makrophagen-Differenzierung fördert. PU.1 wurde außerdem als direkter Aktivator des IL-7R $\alpha$ -Gens identifiziert und ist somit wichtig für die IL-7-abhängige B-Zell-Differenzierung (Busslinger, M., 2004).

Der Transkriptionsfaktor E2A (TCF3) codiert für die alternativen Spleiß-Produkte E12 und E47, welche zusammen mit HEB und E2-2 der Familie der *basic helix loop helix*-Proteine (bHLH-Proteine) angehören. Da E2A in B-Zellen als Homodimer vorliegt (im Gegensatz zu anderen Geweben, in denen es als Heterodimer vorkommt), haben Mutationen des E2A-Gens in B-Zellen die stärksten Auswirkungen. E2A-Knockout-Mäuse (E2A<sup>-/-</sup>-Mäuse) können nicht nur keine D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>-Rekombination am IgH-Locus durchführen, sie können desweiteren auch nur unspezifische Marker wie IL-7R $\alpha$  und Ig $\beta$  exprimieren, wohingegen RAG1, Ig $\alpha$ , Ig $\mu$ , CD19 und Pax5 nicht nachgewiesen werden können. Die B-Zell-Entwicklung kommt im pro-B-Zell-Stadium zum Erliegen (Busslinger, M., 2004).

Pax5 wird als B-Zell-spezifisches Aktivatorprotein (BSAP) v.a. in frühen pro-B-Zellen und in den Stadien bis zur reifen B-Zelle exprimiert. Es determiniert die Entwicklung zur B-Zelle und hält die B-Zell-Identität während der B-Zell-Entwicklung u.a. durch die Aktivierung von BLNK und CD19 aufrecht. Zusätzlich supprimiert es die Erythro-Myeloopoese durch die Repression myeloischer und T-Zell-spezifischer Gene, wie M-CSFR und Notch-1. Pax5<sup>-/-</sup>-pro-B-Zellen können in vitro zu funktionstüchtigen

Makrophagen, Osteoklasten, Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen, nicht jedoch zu reifen B-Zellen differenzieren (Busslinger, M., 2004).

### **1.2.3 Epigenetik**

#### **1.2.3.1 Epigenetische Mechanismen**

Epigenetik wurde 1987 von Holliday et al. als „vererbare Veränderungen der Genexpression, welche nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen“, definiert (Holliday, R., 1987). Epigenetische Mechanismen verändern den Zugang zur DNA für DNA-bindende Faktoren und sind ein physiologisches Phänomen. Der wohl bekannteste Mechanismus ist die Repression der Gentranskription über DNA-Methylierung durch DNA-Methyltransferasen (DNMT). Die DNA-Methylierung findet an sogenannten CpG-Inseln (CpG-Dinukleotid) statt, die sich v.a. um die Promotorbereiche der Gene herum befinden (Herman, J.G. et al., 2003; Weber, M. et al., 2007; Esteller, M., 2008). DNA-Hypermethylierung wird physiologischerweise dazu genutzt, gewebespezifische Gene wie z.B. keimzellspezifische Gene zu kontrollieren und durch die Repression repetitiver Sequenzen und Transposons zur chromosomalen Stabilität beizutragen. Das genomische Imprinting und die X-Chromosom-Inaktivierung bei der Frau unterliegen demselben Mechanismus (Esteller, M., 2008). DNA-Methylierungsprozesse laufen nicht isoliert ab, sondern finden im Zusammenspiel mit Histonmodifikationen statt. Histone sind keineswegs nur DNA-Verpackungsmoleküle, sondern auch wichtiger Bestandteil epigenetischer Genregulationsmechanismen. Die Informationen dafür liefern posttranslationale Modifizierungen einzelner Aminosäuren der Histone, wie z.B. die Lysin-Acetylierung, die Arginin- und Lysin-Methylierung oder die Serin-Phosphorylierung. Jede Histonmodifikation hat ihren eigenen Histon-Code. So führen Acetylierungen durch Histon-Acetylasen (HAT) generell zu transkriptioneller Aktivität (Mack, G.S., 2006; Bernstein, B.E. et al., 2007), wohingegen Deacetylierungen durch Histon-Deacetylasen (HDAC) zur Transkriptionsrepression führen (Esteller, M., 2008). Methylierungen (Mono-, Di- und Trimethylierung) können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. Im Zusammenspiel der genomischen Veränderungen mit den

Histonmodifikationen findet man somit bei supprimierter Gentranskription neben hypermethylierten CpG-Inseln der Promotorbereiche auch deacetylierte Histone H3 und H4, eine verminderte H3K4-Trimethylierung, eine erhöhte H3K9-Trimethylierung und eine erhöhte H3K27-Trimethylierung (Ballestar, E. et al., 2003; Jones, P.A. et al., 2007; Esteller, M., 2008). Bei aktivierter Gentranskription sind hingegen hypomethylierte Promotorregionen, Histon-Acetylierungen, eine erhöhte H3K4-Trimethylierung, eine verminderte H3K9-Trimethylierung und eine verminderte H3K27-Trimethylierung zu beobachten (Esteller, M., 2008). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die beschriebenen Konstellationen.

<b>Aktivierung der Gentranskription</b>	<b>Repression der Gentranskription</b>
CpG-Hypomethylierung	CpG-Hypermethylierung
Histon-Acetylierung	Histon-Deacetylierung
H3K4-Trimethylierung erhöht	H3K4-Trimethylierung vermindert
H3K9-Methylierung vermindert	H3K9-Methylierung erhöht
H3K27-Trimethylierung vermindert	H3K27-Trimethylierung erhöht

**Tabelle 2:** Epigenetische Veränderungen bei Transkriptionsaktivierung und Transkriptionsrepression

### 1.2.3.2 Fehlregulationen in Tumorzellen

In Tumorzellen finden sich häufig globale DNA-Hypomethylierung, hypermethylierte Tumorsuppressorgene und hypermethylierte micro-RNAs. Globale Hypomethylierung fördert über die Reaktivierung von Transposons und repetitiven Elementen und durch Verlust des genomischen Imprintings die chromosomale Instabilität. Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen ist ein häufig beobachtetes Phänomen in Tumorzellen. Man findet es u.a. beim Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Harnblasenkarzinom, in Lymphomen und Leukämien. Als bekannteste Beispiele können das Rb-Gen (Retinoblastom-Gen), das VHL-Gen (von-Hippel-Lindau-Erkrankung), das BRCA1-Gen (*breast cancer 1*-Gen) und diverse DNA-Reparaturgene (u.a. MLH1, MGMT) genannt werden (Esteller, M., 2008). In Leukämien betrifft die CpG-Hypermethylierung v.a. Gene für Reparatur (MGMT) (Rossi, D. et al., 2004), Detoxifikation (GSTP1)



(Rossi, D. et al., 2004), Apoptose (Dap-k, LATS2, DLX3) (Roman-Gomez, J. et al., 2004; Jimenez-Velasco, A. et al., 2005; Campo Dell'Orto, M. et al., 2007), Zellzyklus und Wachstum (p15, p16, p21, DKK3, NES1, TP53, ASPP1, WNT5a) (Guo, S.X. et al., 2000; Roman-Gomez, J. et al., 2002; Agirre, X. et al., 2003; Roman-Gomez, J. et al., 2004; Roman-Gomez, J. et al., 2004; Agirre, X. et al., 2006; Roman-Gomez, J. et al., 2007). Jeder Tumor besitzt sein Hypermethylom, eine persönliche Zusammenstellung von Genen, die im Laufe der Transformation hypermethyliert werden. Auch Histonmodifikationen werden zur Repression von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. von p21 herangezogen (Esteller, M., 2008). Die Bedeutung der micro-RNAs (miRNA) als Tumorsuppressorgene wird erst deutlich, wenn deren Expression durch CpG-Hypermethylierung supprimiert wird. miRNAs sind nicht codierende RNAs, die durch die Bindung an spezifische Ziel-mRNAs die Translation aktivieren. Wird die Expression der miRNA inhibiert, so wird die Ziel-mRNA abgebaut und die Translation inhibiert. Die Repression der miR-124a-miRNA ist ein gängiger Mechanismus in der ALL des Erwachsenen, und trägt über die Aktivierung des Cyclin-D-Kinase-6-Onkogens (CDK6) zur Transformation der Zelle bei (Lujambio, A. et al., 2007; Agirre, X. et al., 2009).

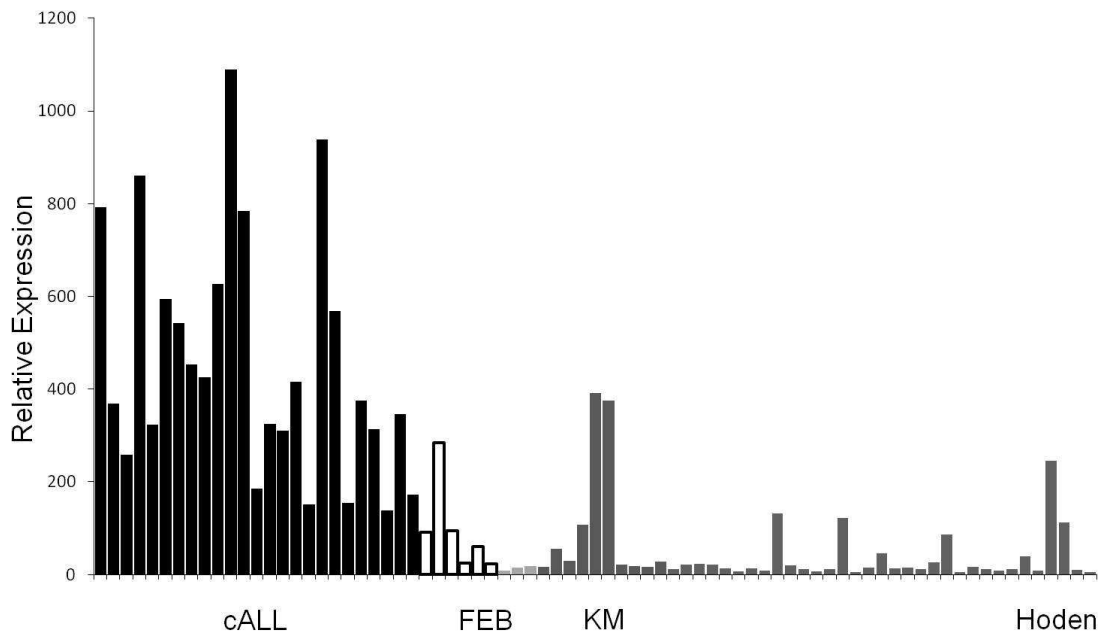
### **1.3 HELLS (Helikase, lymphozytenspezifisch)**

Eine von Richter et al. durchgeführte Microarray-Analyse hochaufgereinigter fetaler B-Lymphozyten (*purified fetal early B cells*, FEBp) und cALL-Zellen (Beinvogl, B., 2009) identifizierte diverse Gene, die in den Leukämiezellen differenziell exprimiert waren. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl der signifikant überexprimierten Gene.

<b>Name des Gens</b>	<b>Abkürzung</b>
Serine/Threonine kinase 32B	STK32B
Deoxynucleotidyltransferase, terminal	DNTT
POU class 4 homeobox 1	POU4F1
Pre-B lymphocyte gene 1	VPREB1
SRY (sex determining region Y)-bo1	SOX4
Split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 3 pseudogene	SHFM3P1
Chromosome 21 open reading frame 96	C21orf96
MLX interacting protein	MLXIP
<b>Helicase, lymphoid specific</b>	<b>HELLS</b>
Suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2
Peroxidasin homolog (Drosophila)	PXDN
E2F transcription factor 1	E2F1
V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4
Membrane metallo-endopeptidase	MME (CD10)

**Tabelle 3:** Differenzielle Expression in cALL-Zellen (sortiert nach abfallender Signifikanz)

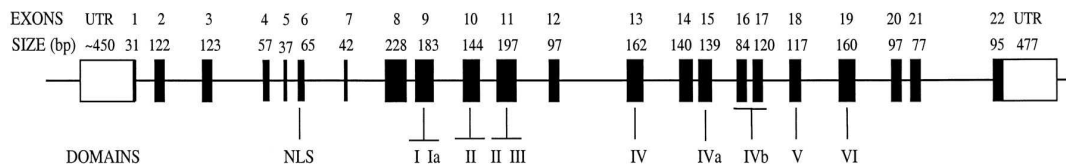
Die Entscheidung, im Rahmen meiner Doktorarbeit die Helikase HELLS zu untersuchen, beruhte auf zwei Aspekten. Einerseits ist die Expression von HELLS in den cALL-Tumorzelllinien 697 und Nalm6 gegenüber Normalgeweben und hochaufgereinigten fetalen B-Zellen signifikant erhöht (Abbildung 2). Andererseits wird HELLS in der Literatur mehrfach als epigenetischer Regulator beschrieben. Hinsichtlich dessen, dass epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener maligner Erkrankungen einnehmen, erschien es mir wichtig, herauszufinden, ob HELLS über die Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen an der Pathogenese der kindlichen cALL beteiligt ist.



**Abbildung 2:** HELLS-Expression in verschiedenen Geweben

HELLS (Helikase, lymphozytenspezifisch) ist Mitglied der SWI / SNF-Familie, einer Familie ATP-abhängiger Chromatin-Umbildungs-Komplexe, die Histon-DNA-Interaktionen auflösen können und es so dem Nukleosom ermöglichen, an der DNA entlang zu gleiten. Sie verändern somit die Zugänglichkeit zur DNA für Transkriptionsfaktoren und andere DNA-bindende Faktoren (Geiman, T.M. et al., 2000; Yan, Q. et al., 2003). Wie sie an ihre Ziel-DNA gelangen ist allerdings noch unklar (Geiman, T.M. et al., 2001). Das HELLS-Gen hat eine große Ähnlichkeit zu der Familie der SNF2-Gene (Lee, D.W. et al., 2000). SNF-Mitglieder (Sucrose-Nonfermenter) umfassen eine Familie verschiedenster Gene, die für Mechanismen der Reparatur (RAD5, RAD16, RAD54), Transkription (Brahma, ATRX, SNF2), Proliferation (MOT1, STH1, ISWI, BRG, BRM) und Methylierung (DDM1: *decrease in DNA methylation I*, SNF2 Mitglied in Pflanzen) verantwortlich sind. SNF2-Mitglieder wiederum sind im Zusammenhang mit Chromatin-Umbau (*remodeling*) (Jarvis, C.D. et al., 1996; Geiman, T.M. et al., 1998), DNA-Reparatur, Replikation, Rekombination, Methylierung und Transkription beschrieben (Lee, D.W. et al., 2000). Die meisten

SNF2-Mitglieder agieren in großen Multiproteinkomplexen (SWI / SNF). HELLS wirkt dagegen als monomeres Protein (Myant, K. et al., 2008). Der Name lymphozyten-spezifische Helikase (*lymphoid specific helicase*, LSH), wie HELLS in Mäusen bezeichnet wird, entsprang der ursprünglichen Annahme, dass dieses Gen nur in Lymphozyten exprimiert wird (Jarvis, C.D. et al., 1996). Der Name PASG (*proliferation associated SNF2 like gene product*) (Lee, D.W. et al., 2000) soll dagegen verdeutlichen, dass HELLS in allen sich schnell teilenden Geweben exprimiert wird (Raabe, E.H. et al., 2001). Der Genlocus wird SMARCA6 (*SWI / SNF2-related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 6*) genannt (Lee, D.W. et al., 2000). Das HELLS-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q23-q24), einem Chromosom, welches in T-Zell-Leukämien häufig von Translokationen betroffen ist (Geiman, T.M. et al., 1998). Das Gen besteht aus 22 Exons, die das offene Leseraster (*open reading frame*) codieren (Abbildung 3). Die meisten Helikasemotive liegen in nur einem Exon, nur Domäne II liegt zwischen 2 Exons (Exon 10 und 11). HELLS besitzt am N-Terminus eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS). Dies legt nahe, dass HELLS überwiegend im Kern vorhanden ist und wirkt.



**Abbildung 3:** Intron-/ Exon-Grenzen des PASG-Gens (Lee et al., 2000)

In Exon 18 befindet sich eine Spender-Spleiß-Sequenz (*donor splice sequence*), die bei dem Prozess des alternativen Spleißens zum Verlust der Nukleotide 2014 bis 2088 und damit von 25 Aminosäuren des Exon 18 führt (Lee, D.W. et al., 2000). Das verlorene Stück beinhaltet auch eine Helikasedomäne. Da es sich um eine *in frame*-Mutation handelt, kann trotz dessen eine komplette mRNA gebildet werden. Diese 75bp-Deletion findet sich in 21,4 % leukämischer Blasten adulter Patienten mit akuter prä-B-Zell-ALL, wohingegen sie in gesunden Geweben wie Thymus, Knochenmark

oder Lymphozyten nicht nachgewiesen werden kann (Lee, D.W. et al., 2000). Im Gegensatz zur ubiquitären Expression der anderen SNF2-Mitglieder wird HELLS nur während der Embryogenese ubiquitär exprimiert (Huang, J. et al., 2004). Danach findet sich die HELLS-mRNA vorwiegend in Thymus, Hoden, Knochenmark und in aktivierten Lymphozyten, also in Geweben mit vielen sich differenzierenden und replizierenden Zellen (Geiman, T.M. et al., 2001). Eine hohe Proteinexpression von HELLS kann während des Zellzyklus festgestellt werden, was eine Assoziation mit Proliferationsvorgängen nahelegt (Geiman, T.M. et al., 2001). Geklont wurde HELLS zum ersten Mal 1996 von Jarvis et al. (Jarvis, C.D. et al., 1996) aus einer T-Vorläuferzell-Bibliothek. Da  $LSH^{-/-}$ -Mäuse perinatal mit niedrigem Geburtsgewicht und schweren renalen und lymphoiden Defekten sterben (Geiman, T.M. et al., 2000; Geiman, T.M. et al., 2001; Huang, J. et al., 2004), wurden diverse Modelle entwickelt, die ein Maus-Knockout-Modell imitieren. Dafür werden ca.  $3 \times 10^6$  hämatopoetische Vorläuferzellen zwischen dem 14. und 18. Gestationstag aus der Leber von  $LSH^{-/-}$ -Mäusen entnommen und in immungeschwächte Mäuse, wie z.B.  $Rag2^{-/-}$ - oder C57BL/6J-Mäuse, gegeben (Geiman, T.M. et al., 2000; Fan, T. et al., 2008), die zuvor mit einer Strahlendosis von ca. 9,5 Gray letal bestrahlt worden waren. Die Funktionen von HELLS werden in der Literatur vielfältig beschrieben. Ein Zusammenhang mit Proliferationsvorgängen und der lymphoiden Entwicklung wird vermutet (Geiman, T.M. et al., 2000; Dennis, K. et al., 2001; Raabe, E.H. et al., 2001; Fan, T. et al., 2003), da  $LSH^{-/-}$ -Mäuse neben einer reduzierten Thymozytenzahl bei normaler VDJ-Rekombination starke Entwicklungsdefekte zeigen (Dennis, K. et al., 2001; Fan, T. et al., 2003). Zudem gibt es einige Hinweise dafür, dass HELLS als Regulator von CpG- und Histon-Methylierung dient (Yan, Q. et al., 2003; Myant, K. et al., 2008). Dabei interagiert HELLS vorwiegend mit perizentromerem Heterochromatin und ist wichtig für die physiologische CpG-Methylierung perizentromerer Sequenzen. Heterochromatin besteht hauptsächlich aus repetitiven Sequenzen und ist wichtig für die Genrepression, die normale Zentromerfunktion und die nukleäre Organisation. Es besitzt im Gegensatz zu Euchromatin hypermethylierte DNA-Abschnitte, eine geringe H3K4- und eine erhöhte H3K9-Methylierung (Yan, Q. et al., 2003). Desweiteren wird diskutiert, ob HELLS auch an der Repression von Differenzierungsgenen durch den

EZH2-vermittelten Polycomb-Repressionskomplex (PRC) eingebunden ist (Xi, S. et al., 2007). EZH2 (*enhancer of zeste*, *Drosophila*, Homolog 2) ist zusammen mit EED (*embryonic ectoderm development*) und SUZ12 (*suppressor of zeste 12*) Teil des PRC2-Komplexes und bewirkt durch seine Methyltransferaseaktivität über die H3K27-Methylierung die Repression verschiedener Gene. Die Arbeitsgruppe (AG) Richter (Labor für Funktionelle Genomik & Transplantationsbiologie im Forschungszentrum für krebskranke Kinder der TU München) konnte zeigen, dass EZH2 über die Repression von endothelialen und neuroektodermalen Differenzierungsgenen und die Förderung von Stammzellmarkern die Stammzeleigenschaften der Tumorzelle im Ewing-Tumor (ET) aufrechterhält (Richter, G.H. et al., 2009). Es ist bekannt, dass der PRC-Komplex Differenzierungsgene in murinen embryonalen Stammzellen (MES) reprimiert (Boyer, L.A. et al., 2006; Jorgensen, H.F. et al., 2006) und den undifferenzierten Stammzell-Phänotyp in embryonalen neuronalen Stammzellen aufrechterhält (Roman-Trufero, M. et al., 2009). V.a. Hox-Gene und andere Differenzierungsgene sind Ziel dieses Repressionsmechanismus (Boyer, L.A. et al., 2006). Hox-Gene sind Transkriptionsfaktoren, die wichtig sind für die Entwicklung vieler Gewebe, darunter auch des hämatopoetischen Systems (Buske, C. et al., 2000; Ferrando, A.A. et al., 2003; Pui, C.H. et al., 2004; Krivtsov, A.V. et al., 2007). Methylierte Hox-Gene zeigen hierbei eine stillstehende Pol-II-Aktivität, wohingegen hypomethylierte Gene eine aktivierte Pol-II-Aktivität besitzen (Xi, S. et al., 2007). Die Regulation des Hox-Weges wird neben dem PRC-Komplex auch von der H3K4-Methyltransferase MLL (*mixed lineage leukemia*) übernommen (Pui, C.H. et al., 2004; Krivtsov, A.V. et al., 2007).

### **1.4 Fragestellung und Zielsetzung**

Durch die Vorarbeiten der AG Richter und die Hinweise in der Literatur zur Funktion von HELLS kam die Frage auf, welche Rolle HELLS in der Pathogenese der pädiatrischen cALL spielt. Ziel der Promotionsarbeit ist es, herauszufinden, ob HELLS über die Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen an der Pathogenese der

kindlichen cALL beteiligt ist. Es wird zudem untersucht, ob HELLS in den Tumorzellen Einfluss auf kontaktunabhängiges Wachstum oder Apoptosemechanismen besitzt und ob es einen Anhalt dafür gibt, dass HELLS Differenzierungsvorgänge in den Tumorzellen beeinflusst. Langfristig gesehen könnte diese Arbeit dazu beitragen, herauszufinden, ob HELLS dazu geeignet ist, als prognostischer Marker der pädiatrischen cALL zu dienen, mit dessen Hilfe die Rezidivwahrscheinlichkeit vorhergesagt werden und so das individuelle Therapiekonzept eines Patienten festgelegt werden könnte. Die Experimente wurden ausschließlich *in vitro* durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden werden die Zellen und Materialien aufgeführt, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde.

#### 2.1.1 Kulturzellen

Humane Vorläufer-B-Zell-Leukämie-Zelllinien: 697, Nalm6 (DMSZ)

#### 2.1.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Name	Hersteller	Ort
RPMI-1640	GIBCO	Carlsbad, USA
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Gentamicin	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Steriles 1-fach PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Selbst hergestellt	
10-fach DPBS	GIBCO	Carlsbad, USA

**Tabelle 4:** Lösungen und Medien für die Zellkultur

#### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller	Ort
1 % PFA	Merck	Darmstadt, Deutschland
0,1 % Triton-X	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
0,8 % Agarose	Invitrogen	Carlsbad, USA
10 % Ammonium-Persulfat (APS)	Merck	Darmstadt, Deutschland
1-fach TAE-Laufpuffer	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
5-fach Transferpuffer	Selbst hergestellt	
2-fach Laemmli-Puffer	Selbst hergestellt	
4 % Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
40 % Acrylamid / Bis-Lösung (29:1)	Merck	Darmstadt, Deutschland
4-fach Puffer ( <i>separating / stacking</i> )	Selbst hergestellt	
5 % Humanes-IgG	CSL-Behring	Parkville, Australien
50 mM NH <sub>4</sub> Cl	Roth	Arlesheim, Deutschland
70 % Ethanol / DEPC-Wasser	Roth	Arlesheim, Deutschland
<i>Antibody dilution solution</i>	Roche	Basel, Schweiz
Anti-BrdU-POD	Roche	Basel, Schweiz
<i>Bench Mark Prestained Protein Ladder</i>	Invitrogen	Carlsbad, USA
<i>BrdU Labeling</i>	Roche	Basel, Schweiz
cDNA-Synthese-Kit	Applied Biosystems	Carlsbad, USA



<i>Cyber Green Master Mix</i>	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DEPC-Wasser	Invitrogen	Carlsbad, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
ECL-Plus	GE Healthcare	Chalfont St Giles, UK
Ethanol	Roth	Arlesheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Färbepuffer (0,2 % FCS in 1-fach PBS, 0,05 % Na-acid)	Selbst hergestellt	
Fix-Denat	Roche	Basel, Schweiz
Isopropanol	Roth	Arlesheim, Deutschland
6-fach Färbepuffer-Lösung	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
Magermilchpulver	Merck	Darmstadt, Deutschland
<i>1 Kb Plus DNA Ladder</i>	Invitrogen	Carlsbad, USA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methanol	Roth	Arlesheim, Deutschland
Nucleofector-Kit-T	Lonza	Basel, Schweiz
RLT-Puffer	Qiagen	Venlo, Niederlande
RNAse-freies Wasser	Qiagen	Venlo, Niederlande
RPE-Puffer	Qiagen	Venlo, Niederlande
RW1-Puffer	Qiagen	Venlo, Niederlande
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (8 Teile H <sub>2</sub> O, 2 Teile Schwefelsäure)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Solution-T-Puffer	Lonza	Basel, Schweiz
Steriles Wasser	Millipore	Billerica, USA
Substrat	Roche	Basel, Schweiz
<i>Tag man Master Mix</i>	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
TBS	Selbst hergestellt	
TBS-T (TBS + 0,05 % Tween-20)	Selbst hergestellt	
TEMED	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trizol	Invitrogen	Carlsbad, USA
Trypanblau	GIBCO	Carlsbad, USA
Waschpuffer	Roche	Basel, Schweiz

**Tabelle 5:** Chemikalien und Reagenzien

### 2.1.4 Small interfering RNAs und Vektoren

<b>Name</b>	<b>Basen-Sequenz</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
Anti-HELLS_7	5'-AAGATCGATGAAGAATTGGTA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-HELLS_5	5'-ATGCGATGGTACCAAGTAGAA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande

Anti-SOX4_1	5'-AAGGACAGACGAAGAGTTTAA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-SOX4_2	5'-CACGGTCAAACCTGAAATGGAT-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-EZH2_2	5'-AAGCAAATTCTCGGTGTCAAA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-EZH2_validiert	5'-AACCATGTTTACAACCTATCAA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-EIF2C1_2	5'-CTCCAAGAATTGTGCAAGTAA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Anti-EIF2C1_3	5'-CAGCTACAACCTAGATCCCTA-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande
Negativ-siRNA	5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'	Qiagen, Venlo, Niederlande

**Tabelle 6:** siRNAs

<b>Name</b>	<b>Antibiotika-Resistenz</b>
pSiren-Vektorsystem	Puromycin

**Tabelle 7:** Vektoren

### 2.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Antikörper

Name	Abkürzung	Art	Herkunft	Konzentration	Hersteller/ Ort
Anti-trimethyl-Histon-H3 (Lys9)	H3K9trime	Polyclonal	Kaninchen	1:1000	Millipore, Billerica, USA
HPRT (FL-218)	HPRT	Polyclonal	Kaninchen	1:500	Santa-Cruz, Dallas, USA
EZH2-Antikörper	EZH2	Polyclonal	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Denvers, USA
Anti-trimethyl-Histon-H3 (Lys4)	H3K4trime	Monoclonal	Kaninchen	1:2000	Millipore, Billerica, USA
Anti-trimethyl-Histon-H3(Lys27)	H3K27trime	Polyclonal	Kaninchen	1:5000	Millipore, Billerica, USA
Anti-acetyl-Histon-H3	H3acetyl	Polyclonal	Kaninchen	1:5000	Millipore, Billerica, USA

## 2 Material und Methoden

---

Histon-H3-Antikörper	H3	Polyclonal	Kaninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, UK
VpreB (5F251)	VPREB1	Monoklonal	Maus	1:200	Santa-Cruz, Dallas, USA

**Tabelle 8:** Primärantikörper

Name	Fluoreszenz-Marker	Konzentration	Hersteller/ Ort
<i>Goat anti-mouse IgG</i>	HRP-markiert	1:1000	Santa-Cruz, Dallas, USA
<i>Bovine anti-rabbit IgG</i>	HRP-markiert	1:1000	Santa-Cruz, Dallas, USA

**Tabelle 9:** Sekundärantikörper

Name	Fluoreszenz-Marker	Hersteller/ Ort
<i>Mouse anti-human-CD43</i>	APC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Mouse anti-human-CD79<math>\alpha</math></i>	APC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Mouse anti-human-CD24</i>	PE-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Mouse anti-human-CD22</i>	FITC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Rat anti-mouse-IgG1</i>	PE-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Mouse anti-human-IL-7R<math>\alpha</math></i>	APC-gekoppelt	R&D-Systems, Minneapolis, USA
<i>Anti-human-HLA-ABC</i>	APC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Anti-human-CD25</i>	FITC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Anti-human-CD19</i>	FITC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Mouse anti-human-CD19</i>	PE-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Anti-human-CD10</i>	PE-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Anti-human-HLA-DR</i>	PE-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
<i>Anti-human-CD20</i>	APC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA

<i>Anti-human-HLA-A2</i>	FITC-gekoppelt	BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA
Annexin V-PE Apoptose-Detektions-Kit-I		BD-Pharmigen, Franklin Lakes, USA

**Tabelle 10:** Fluoreszenz-markierte Antikörper

### 2.1.6 Primer-Assays

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
ACTB	Qiagen	Venlo, Niederlande
ATRX	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
BHLE40	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
Cdkn1c	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
DICER1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
DUB3	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
EGR1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
EZH2	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
GAPDH	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
HELLS	Qiagen	Venlo, Niederlande
LRRFIP1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
RFC1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
RNF2	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
SIRT4	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
SOX4	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
SUV39H1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
TGFB1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
WEE1	Applied Biosystems	Carlsbad, USA

**Tabelle 11:** Primer-Assays

### 2.1.7 Arrays

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>Gene Chip Human Gene 1.0 ST Arrays</i>	Affymetrix	Santa Klara, USA

**Tabelle 12:** Arrays

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
23 G + 26 G Kanülen	Braun	Melsungen, Deutschland
20 x 26 mm Deckgläschen	Roth	Arlesheim, Deutschland
5 ml Spritzen	Braun	Melsungen, Deutschland

6-, 12-, 24- und 96- (Rund-) <i>well</i> -Platten	TPP	Trasadingen, Schweiz
80 % Ethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PVDF-Membran	GE Healthcare	Chalfont St Giles, UK
Blotting-Papiere	Schleicher und Schuell	Chalfont St Giles, UK
Desinfektionsmittel	Ecolab	Saint Paul, USA
1,5 ml Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falconröhrchen	BD-Pharmigen	Franklin Lakes, USA
Handschuhe	Sempermed	Wien, Österreich
Kämme	Biometra	Göttingen, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Objektträger mit Neubauer-Zählkammer	Roth	Arlesheim, Deutschland
Parafilm	Pechiney	Paris, Frankreich
Pipettenspitzen	Fisher Scientific	Waltham, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Poly-D-Lysin beschichtete 24- <i>well</i> -Platten	BD-Pharmigen	Franklin Lakes, USA

**Tabelle 13:** Verbrauchsmaterialien

### 2.1.9 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Abzug	Köttermann	Gossau, Schweiz
Blot-Kammer	Biometra	Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Heraeus	Wehrheim, Deutschland
Cycler	Biorad	Hercules, USA
Durchflusszytometer	BD-Pharmigen	Franklin Lakes, USA
Western-Blot-Elektrophorese-Kammer	Biometra	Göttingen, Deutschland
Elektroporationsgerät	Lonza	Basel, Schweiz
ELISA-Reader	Thermo Scientific	Waltham, USA
Ethidiumbromidkammer	Thermo Scientific	Waltham, USA
Feinwaagen	Kern&Sohn	Balingen, Deutschland
Filmentwickler	Carestream Health	Rochester, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Heizer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kühlschränke	Siemens	München, Deutschland
Linearschüttler	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Luminometer	Berthold	Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	PCE Deutschland	Meschede, Deutschland
Mikroskope	Leica	Wetzlar, Deutschland
<i>Mister Frosty</i>	Nalgene	Darmstadt, Deutschland
Ohrenplatten	Biometra	Göttingen, Deutschland
pH-Meter	WTW	Weilheim, Deutschland

Photometer	Biochrom	Berlin, Deutschland
Pipetboy	Integra Bioscience	Landquart, Schweiz
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Real-Time-PCR-Maschine	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
Silikonbänder	Biometra	Göttingen, Deutschland
Spannungsquellen	Biorad	Hercules, USA
Sterilbank Hera Safe	Heraeus	Wehrheim, Deutschland
Trafos	Alphametrix	Rödermark, Deutschland
Vortex	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus	Wehrheim, Deutschland

**Tabelle 14:** Geräte

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur mit Suspensionszellen

Die humanen B-Zell-Vorläufer-Leukämie-Zelllinien 697 und Nalm6 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die 697-Zellen entstammten dem Knochenmark eines 12 Jahre alten Jungen mit rezidivierender cALL, die Nalm6-Zellen dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes mit Rezidiv einer nicht näher klassifizierten ALL. Die Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 0,5 bis  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und einer Innenatmosphäre des Brutschranks von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zu Beginn der Kultivierung ließ man die Zellen in einer 24-well-Platte anwachsen. Für die Anzüchtung beider Zelllinien wurde RPMI-1640 Medium verwendet. Dieses wurde 1:5 mit fetalem bovines Serum (FBS) und 50 mg / ml Gentamicin versetzt. Das FBS wurde zuvor für 30 Min. bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Hitzeinaktivierung dient der Komplement-, Fibrinogen- und Enzymzerstörung und beseitigt allgemein störende Einflüsse des Serums wie Viren und Mykoplasmen (Naumann, L., 2005). Waren die Zellen von Mykoplasmen befallen, wurde eine Sanierung mit BM-Cyclin (Roche Applied Science) durchgeführt. Dieses Kit besteht aus einer Antibiotikakombination eines Pleuromutilins und eines Tetrazyklins. Gemeinsamer Angriffspunkt ist die Hemmung der Proteinsynthese durch Inhibition der Ribosomen.

### **2.2.2 Zellzählung und Vitalitätsmessung**

Die Zellen wurden gemäß der zu erwartenden Zellzahl in einem definierten Volumen Medium resuspendiert und 10 µl dieser Suspension 1:1 mit einer 0,4-prozentigen Trypanblaulösung vermischt. Die Hälfte dieser Suspension wurde auf einen Objektträger mit einer Neubauer-Zählkammer gegeben und unter 10-facher Vergrößerung mikroskopiert. Trypanblau gelangt nur in Zellen mit einer defekten Zellmembran, weswegen nur nekrotische oder apoptotische Zellen blau angefärbt werden, lebende Zellen jedoch ungefärbt bleiben. Die lebenden Zellen wurden nun in 2 (von 4) Großquadraten (entspricht 32 Kleinquadraten) ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung durch das Trypanblau hochgerechnet.

### **2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Aufbewahrung der Suspensionszellen erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es wurde eine Zellsuspension mit ca. 1 bis  $5 \times 10^6$  Zellen 5 Min. lang bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 1 ml FBS mit 10 % DMSO (dient als Frostschutzmittel) resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Vor der Lagerung im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Schrank mussten die Proben 24 Std. in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Die Zellen können ca. 1 Monat im  $-80^{\circ}\text{C}$  Schrank verweilen, danach sollen sie bis zur Wiederverwendung im flüssigen Stickstofftank gelagert werden. Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde das Kryoröhrchen direkt nach Entnahme aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Schrank 5 Min. lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert und hierauf in ein mit RPM40-Medium bestücktes Falconröhrchen gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und Raumtemperatur wurden sie gezählt und in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml (siehe 2.2.2) in Kulturflaschen ausgesät und in den Brutschrank gestellt. Die abgestorbenen Zellen und das restliche DMSO wurden nach 2-3 Tagen Wachstumsphase durch Zentrifugation und Mediumwechsel oder Waschen mit 1-fach PBS entfernt.

### 2.2.4 RNA-Isolierung

#### 2.2.4.1 Quiagen-Methode

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy-Mini-Kit von Qiagen verwendet. Mit dieser Methode können RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Nukleotiden isoliert werden. Somit kommt es vorwiegend zu einer Anreicherung von mRNA. Das spezielle Hochsalz-Puffersystem ermöglicht die Bindung von bis zu 100 µg RNA an die Silikonmembran. Die gesamte RNA-Isolierung erfolgte auf Eis. Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde autoklaviertes Material verwendet und ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Dieses Verfahren kombiniert die selektive Bindungseigenschaft einer Silikongel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik. Das Pellet von 1 bis  $2 \times 10^6$  Zellen wurde zunächst in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen. RLT-Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, lysiert die Plasmamembran und inaktiviert RNasen. Im nächsten Schritt wurden 350 µl 70-prozentiges Ethanol in DEPC-Wasser zum Lysat hinzugefügt und das Gemisch auf die RNeasy-Spin-Säule, die sich in einem 2 ml Sammelgefäß befand, gegeben. Ethanol fördert die selektive Bindung der RNA an die Membran der Säule. Die Säule wurde nun bei 13000 rpm (entspricht 13000 U / Min.) in einer auf 4°C heruntergekühlten Zentrifuge 20 s lang zentrifugiert. Die Gesamt-RNA bindet dabei an die Membran. In drei Waschschrritten mit verschiedenen Puffern wurden nun Verunreinigungen entfernt. Zunächst wurde mit 600 µl RWI-Puffer, daraufhin mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, woran sich beide Male eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 s anschloss. Ein abschließender Waschvorgang mit 300 µl RPE-Puffer endete mit einer 2-minütigen Zentrifugation bei gleicher Umdrehungszahl. Hierbei wurden Ethanolreste aus dem RPE-Puffer herausgelöst, welche die weiteren enzymatischen Reaktionen sonst gestört hätten. Nun wurden die Proben mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und 1 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die durchschnittliche RNA-Ausbeute lag zwischen 15-30 µg.

#### 2.2.4.2 Trizol-Methode

Mit der Trizol-Methode kann RNA und DNA gleichzeitig gewonnen werden. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,2 ml Trizol aufgenommen und durch eine 19 G-Kanüle



gezogen. Pro 2 ml Homogenat wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben, die Probe für 1 Min. auf dem Vortexer gemischt und 5 Min. lang auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe bei 4000 rpm für 15 Min. bei 15°C zentrifugiert. Die Proben teilen sich in drei übereinanderliegende Phasen. In der oberen Phase befindet sich die RNA. Diese wurde abgesaugt, 1:1 mit Isopropanol versetzt und eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach Entfernung der geringen Überreste an wässriger Phase können auch die zweite Phase (Interphase) und die dritte Phase (Phenolphase) abgesaugt und für die spätere DNA-Isolierung bei 6°C aufbewahrt werden. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die RNA-Proben bei 4000 rpm 15 Min. lang bei 15°C zentrifugiert und zweimal in 70-prozentigem Ethanol / DEPC-Wasser gewaschen. Das Pellet wurde 5 bis 10 Min. lang bei Raumtemperatur getrocknet und in die entsprechende Menge DEPC-Wasser aufgenommen. Die Trizol-Methode fand lediglich bei der RNA-Isolierung für die Microarray-Proben Anwendung, da mit dieser Methode häufig eine größere Reinheit der RNA zu erzielen ist. Die täglichen RNA-Isolierungen wurden mit der Quiagen-Methode gewonnen, da man hierbei meist eine größere Ausbeute erzielt.

### **2.2.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen RNA, wurde diese 1:100 in DEPC-Wasser verdünnt und die Extinktion im Photometer gemessen. Hierbei wird die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge während seiner Passage durch das RNA-Gemisch gemessen. Die Extinktion ist umso größer, je mehr RNA im Gemisch vorhanden ist. RNA besitzt ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, viele Proteine haben dagegen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Reinheit der RNA lässt sich durch den Quotienten  $E_{260} : E_{280}$  abschätzen. Liegt er zwischen 1,8 und 2,1, spricht dies für eine hohe Reinheit. Ein Quotient unter 1,8 weist auf einen hohen Verunreinigungsgrad der RNA hin.

### **2.2.4.4 Qualitätsbestimmung der RNA**

Die Integrität der RNA wurde in denaturierenden 0,8-prozentigen Agarose-Gelen bestimmt. Zum Herstellen des 0,8-prozentigen Gels wurden 1,6 g Agarose mit 200 ml 1-fach TAE-Laufpuffer in einen Kolben gefüllt und für 4 Min. bei 600 W in der

Mikrowelle aufgeköcht. Nach 10-minütigem Auskühlen wurde 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, das Gel in die mit RNase-Zap gereinigte Kammer gegossen und Kämme hinzugefügt. Nachdem das Gel hart geworden war, wurden die Kämme wieder entfernt und die Proben in die Taschen gefüllt. Die Proben bestanden aus 0,5 bis 1 µg RNA, die mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und mit 2 µl Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % Bromphenol-Blau, 0,03 % Xylen-Zyanol-FF, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA) versetzt worden waren. Als Kontrollproben dienten 1 µl Marker (*1Kb Plus DNA Ladder*) und 19 µl DEPC-Wasser mit 2 µl Ladepuffer. Die Proben liefen ca. 1 Stunde bei 75 V.

### 2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese basiert auf dem Prinzip der reversen Transkription. Dabei wird die gewonnene RNA in DNA umgeschrieben. Da mRNA nur codierende Basensequenzen (Exons) enthält, bezeichnet man die synthetisch hergestellte DNA als cDNA. Um cDNA herzustellen, wurde 1 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl Master-Mix versehen. Das cDNA-Synthese-Kit wurde von Applied Biosystems bezogen. Für die Herstellung des Master-Mixes wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Menge	Reagenzien
2 µl	Puffer
2 µl	Randomisierte Primer
0,8 µl	dNTP
4,2 µl	DEPC-Wasser
1 µl	Reverse Transkriptase

**Tabelle 15:** Pipettierschema Master-Mix

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler (Biorad) bei folgenden Zyklen:

Dauer	Temperatur
10 Min.	25°C
120 Min.	37°C
5 Min.	85°C
∞	4°C

**Tabelle 16:** Zyklen reverse Transkription

Die Produkte der reversen Transkription waren Ausgangsmaterial für die qRT-PCR.

### 2.2.6 qRT-PCR

Zur Untersuchung der Expressionsstärke eines Gens auf mRNA-Ebene wurde eine quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dies ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) beruht und zusätzlich eine Quantifizierung der untersuchten cDNA ermöglicht. Während eines PCR-Zyklus finden Fluoreszenzmessungen statt, anhand derer die Quantifizierung durchgeführt wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die nur wenige Zyklen in einem Lauf einnimmt) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da hier die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung vornehmen. Für nachfolgend beschriebene Versuche wurden sowohl die *Cyber Green* als auch die *Tag Man*-Methode verwendet. *Cyber Green* ist ein Cyanin-Farbstoff, der in Doppelstrang-DNA interkalieren kann und grünes Licht (520 nm) emittiert. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz. Die Messung findet am Ende der Elongation nach jedem Zyklus statt. Grundlage der *Tag Man*-Methode sind Sonden, die den sogenannten *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) ausnutzen. Die *Tag Man*-Sonden sind an ein Donorfluorochrom (Reporter) und ein Akzeptorfluorochrom (Quencher) gekoppelt. Wird der Reporter durch eine Lichtquelle angeregt, gibt er einen Teil seiner Energie an den sich in der Nähe befindenden Quencher ab. Entfernen sich die beiden Teilchen voneinander, nimmt der Energietransfer, und damit das Fluoreszenzsignal des Quenchers ab, während das des Reporters zunimmt. Die *Tag*-Polymerase, die eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, baut die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs am 5'-Ende ab. Dadurch entfernen sich Quencher und Reporter voneinander und ein gesteigertes Fluoreszenzsignal des Reporters kann gemessen werden. Die Messung findet wie bei der *Cyber Green*-Methode am Ende der Elongation jedes Zyklus statt. Die *Cyber Green*-Primer-Assays HELLS und ACTB wurden von Qiagen, die *Tag Man* Primer-Assays und beiderlei Master-Mixe von Applied Biosystems erworben.

Zur Durchführung des Experiments wurde folgendes Pipettierschema angewendet:

Method	Master-Mix	Sonde	DEPC-Wasser	cDNA
<i>Cyber Green</i>	12,5 µl	1 µl	11 µl	0,5 µl
<i>Tag Man</i>	12,5 µl	1,25 µl	10,75 µl	0,5 µl

**Tabelle 17:** Pipettierschema qRT-PCR

Das Gemisch wurde auf Eis in eine 96-well-Platte von Applied Biosystems pipettiert, kurz abzentrifugiert und in die Real-Time-PCR-Maschine von Applied Biosystems gestellt. Es wurden 40 Zyklen und 4 Läufe bei einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Ct-Wert ermittelt, der den Beginn der exponentiellen Phase darstellt. In dieser kann eine Aussage über die Quantifizierung der Proben getroffen werden. Anhand der Ermittlung der  $\Delta$ Ct-Werte kann daraufhin auf die Expressionsstärke des jeweiligen Gens rückgeschlossen werden.

### 2.2.7 RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen Mechanismus, durch den die Expression eines Zielgens durch eine *small interfering RNA* (siRNA) supprimiert werden kann. Es handelt sich dabei um einen physiologischen Schutzmechanismus der Zelle gegen Viren oder Transposons. Gelangt eine lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine Zelle, so wird diese durch das RNase-III-Enzym Dicer in RNA-Fragmente von ca. 22 Nukleotiden zerschnitten (siRNAs). Diese siRNA-Komplexe werden anschließend durch das zelluläre *transactivating response RNA binding protein* (TRBP) zum *RNA induced silencing complex* (RISC) transportiert. Der siRNA-Strang wird nun in den RISC-Komplex eingebaut und in seine beiden Einzelstränge gespalten. Darauffolgend bindet der komplementäre mRNA-Strang der Zelle an den siRNA-Einzelstrang und wird durch eine katalytische Untereinheit von RISC, Argonaute 2 (Ago2), abgebaut. Hierbei spielt die Piwi-Domäne von Ago2 eine wesentliche Rolle, da diese eine *RNase H like*-Endonukleaseaktivität besitzt. Somit können durch Einbringen spezifischer siRNAs in die Zellen bestimmte Zielgene supprimiert werden. Diese Methode wirkt allerdings zeitlich begrenzt, da die Zelle sowohl mRNA nachproduziert als auch die siRNA mit der Zeit wieder abbaut. In diesen Versuchen wurde mit der siRNA HELLS7 gearbeitet.

### 2.2.8 Elektroporation mit siRNA

Die Expression des HELLS-Proteins kann durch siRNA, die gegen die Basensequenz 5'-AAGATCGATGAAGAATTGGTA-3' der Basen 1870 bis 1890 der HELLS-mRNA gerichtet ist, gehemmt werden. Als Negativ-Kontroll-siRNA wurden Oligonukleotide der Firma Qiagen verwendet. Negativ-Kontroll-siRNAs besitzen keine Homologie zu bisher bekannten Genen und haben daher keine Auswirkung auf die Genexpression. Zur Transfektion der Zellen wurde eine Elektroporation durchgeführt. Das Prinzip der Elektroporation besteht darin, dass sich in der Zellmembran der zu transfizierenden Zellen durch Anlegen einer hohen Spannung kurzzeitig Poren bilden, durch die in der Zellsuspension enthaltene doppelsträngige Oligonukleotide in die Zellen eintreten können. Zur Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen gezählt (siehe 2.2.2), in 100  $\mu$ l Solution-T-Puffer (Nucleofector-Kit-T, Lonza) resuspendiert und mit 3  $\mu$ g siRNA (in 10  $\mu$ l DEPC-Wasser) versetzt. Das Gemisch wurde in eine 1 mm dicke Transfektionsküvette pipettiert. Die Küvette wurde in den Küvettenhalter des Elektroporationsgeräts (Nucleofector-I, Amaxa) gesteckt und mit dem Programm C-05 gepulst. Nach der Elektroporation wurden die transfizierten Zellen in 500  $\mu$ l Medium resuspendiert und in eine 24-well-Platte mit 500  $\mu$ l vorgewärmten Medium pipettiert. Die Platte wurde für 48 Stunden im Brutschrank bebrütet.

### 2.2.9 pSIREN-Vektorsystem

Es stehen diverse Vektorsysteme zur Verfügung, um konstitutiv-herunterregulierte Klone zu generieren. Das in dieser Arbeit verwendete System ist das pSIREN-Vektorsystem. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, die Vektoren von der Firma Clontech bezogen. Es wurde der pSIREN-Vektor PT3810-1 (PR58813) verwendet. Die HELLS-Zielsequenz (siHells7) lautete: 5'-AGATCGATGAAGAATTGGTA-3', die der GFP-Kontrolle: 5'-AAGCAGCACGACTTCTTCAAG-3'. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in 1-fach TE (Tris und EDTA) bei einem pH-Wert von 8,0 zu einer 100  $\mu$ M-Lösung gelöst und 1:1 verdünnt, sodass am Ende eine 50  $\mu$ M Arbeitslösung zur Verfügung stand. In einem *annealing*-Schritt (30 s: 95°C, 2 Min.: 72°C, 2 Min.: 37°C, 2 Min.: 25°C) im Thermo-Cycler wurden die Doppelstränge voneinander getrennt und auf Eis

mit TE zu einer 0,5  $\mu\text{M}$ -Lösung verdünnt. Daraufhin wurden der Oligonukleotid *sense*-Einzelstrang und der im Vektor enthaltene *antisense*-Strang in einem Ligationsschritt zusammen gebracht. Für diesen Schritt benötigt man folgende Reagenzien, die ein Gesamtvolumen von 15  $\mu\text{l}$  ergeben:

Menge	Reagenzien
1 $\mu\text{l}$ (50 $\mu\text{g}$ )	RNA <sub>i</sub> -ready-pSIREN-Retro-Q-Vektor (Clontech)
1 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$ Oligonukleotid-Einzelstrang-Lösung
1,5 $\mu\text{l}$	10-fach T4-RNA-Ligase-Puffer
0,5 $\mu\text{l}$ (10 mg / ml)	BSA
10,5 $\mu\text{l}$	Nuklease freies Wasser
0,5 $\mu\text{l}$ (400 U / $\mu\text{l}$ )	T4 DNA-Ligase

**Tabelle 18:** Reagenzien für den Ligationsschritt bei der Herstellung des pSIREN-Vektors

Für die Kontrolle wurde statt der Oligonukleotide 1  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser verwendet. Das Gemisch wurde nun für 3 Std. bei 22°C im Heizbad inkubiert. Der pSIREN-Vektor enthält neben einer Bam- (GATCC) und einer ECOR1-Schnittstelle, einem *hairpin loop* und einer Ampicillin- und Puromycin-Resistenz die zu dem gewünschten Oligonukleotid komplementäre *antisense*-Sequenz, sodass das gewünschte Oligonukleotid nach diesem Arbeitsschritt im Vektor integriert war. Für die Transformation benötigt man kompetente Zellen. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, im umgebenden Gewebe frei befindliche DNA aufzunehmen. Es wurden Top-Ten-F-Zellen (Invitrogen) verwendet, die aus E.coli-Bakterien stammen. Die Zellen müssen zunächst auf Eis aufgetaut werden, um danach in einem Transformationsschritt den Vektor aufzunehmen. Hierfür wurden 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz 30 Min. lang zusammen mit den kompetenten Zellen auf Eis inkubiert, danach für 45 s im Heizer auf 42°C erhitzt, und darauffolgend für 1 bis 2 Min. auf Eis gestellt. Zusammen mit 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium wurden die kompetenten Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. 80  $\mu\text{l}$  des Gemisches wurden auf LB-Amp-Platten (enthalten NaCl, Pepton und Hefe) ausgesät, sodass die resistenten Zellen über Nacht in einem Brutschrank ohne CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C wachsen konnten. Am nächsten Tag wurden die Kolonien geerntet. Dafür wurde ein Einzelzellklon mit einer Pipettenspitze herausgepickt und in ein Falcon-BD-Snap-Cap gegeben, welches 4 ml LB-Medium und 100  $\mu\text{g}$  / ml Ampicillin enthielt. Das Gefäß wurde über Nacht bei 37°C auf einen

Schüttler gestellt. Um nun die vektortragenden (dadurch Ampicillin-resistenten) Zellen zu vermehren, wurden Mini-Präps angesetzt. Die daraus isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen und in 15-prozentige Glycerin-Stocks bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zuvor wurden noch 20 µl Plasmid-DNA abgenommen und zum Sequenzieren verschickt (Sequi-Surf, Vaterstetten). War die Sequenz des gewünschten Oligonukleotids keiner Punktmutation unterlegen, konnten die vektortragenden, kompetenten Zellen in Maxi-Präps vermehrt werden. Dafür wurde von den eingefrorenen Glycerin-Stocks ein kleiner Teil mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in einen Erlenmeierkolben mit 400 ml LB-Medium und Ampicillin gegeben, sodass die Bakterien über Nacht wachsen konnten. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Jet-Star-Säulen (Genomed) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde steril gefällt und per Elektroporation (Biorad) in die Verpackungszelllinie PT-67 eingebracht. Diese enthält u.a. wichtige Enzyme für den Virusaufbau. Die sich nun im Zellüberstand (Virusüberstand) befindende Plasmid-DNA wurde durch eine 0,45 mm dicke Membran steril filtriert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im nächsten Schritt können nun die Zielzellen (in diesem Fall 697 und Nalm6) infiziert werden. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Zielzellen in 1 ml Medium mit 1 ml Virusüberstand und Polybren in eine 12-*well*-Platte gegeben und für 48 Std. bei  $37^{\circ}\text{C}$  und einer 5-prozentigen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre bebrütet. Nach einem Mediumwechsel wurden sowohl die Kontrollzellen als auch die supprimierten HELLS-Zellen mit  $2 \mu\text{g} / \text{ml}$  Puromycin vergiftet. Nach 24 Std. wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt und die noch lebenden Zellen, das heißt die supprimierten HELLS-Zellen mit Vektor, kultiviert. In einer qRT-PCR konnte die Suppression des HELLS-Gens bestätigt werden. Die Experimente, die mit konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen durchgeführt wurden, wurden mit dem Klon HELLS\_32 aus Nalm6-Zellen durchgeführt, da in 697-Zellen keine verlässliche HELLS-Suppression erzielt werden konnte.

### **2.2.10 Methylzellulose-Assay**

Der Koloniebildungs-Assay untersucht, ob Zellen kontaktunabhängig wachsen können. Für die Experimente wurden kommerzielle Methylzellulosemedien und Zell-Resuspensionsmedien von R&D-Systems verwendet. Grundlage des Mediums ist

1,3-prozentige Methylzellulose in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), die mit 25 % FCS, 2 % bovinem Serumalbumin, Glutamin und Mercaptoethanol versetzt ist. Die Zell-Resuspensionslösung enthält 50 % FCS in IMDM. Zur Durchführung des Experiments wurden  $5 \times 10^3$  Zellen in 300  $\mu$ l Zell-Resuspensionslösung aufgenommen und in 3 ml Methylzellulose-Medium pipettiert. Das Falconröhrchen wurde kräftig auf dem Vortexer gemischt. Es wurde 5 bis 10 Min. gewartet, bis entstandene Luftblasen aufgestiegen waren. In der Zwischenzeit wurden 100 mm-Petrischalen mit jeweils drei Petrischalen à 35 mm bestückt. Eine der 35 mm Schalen wurde ohne Deckel mit 5 ml sterilem Wasser befüllt. Die beiden verbleibenden Schalen wurden, nachdem die Luftblasen verschwunden waren, mit je 1,5 ml Methylzellulose versehen. Diese wurde durch leichtes Schwenken der Schale gleichmäßig über den gesamten Boden verteilt. Die Petrischalen wurden für 14 bis 16 Tage bei 37°C und 5-prozentigem CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank bebrütet.

### 2.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Untersuchung des Oberflächenexpressionsprofils einer Zelle. Hierbei werden die Zellen beim Durchwandern der Messkammer einzeln von der Seite von einem Laserstrahler angeleuchtet und emittieren Streulicht, das von Detektoren, sogenannten Photomultipliern, erfasst werden kann. Das Streulicht korreliert mit der Größe und der Komplexität der Zelle. Da die Zelle das Licht in verschiedene Richtungen streut, kann man durch verschieden positionierte Detektoren unterschiedliche Informationen erlangen. Es gibt Detektoren, die Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) und solche, die Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) erkennen können. Das Vorwärtsstreulicht hängt v.a. von der Größe, das Seitwärtsstreulicht dagegen vom Inhalt einer Zelle ab (v.a. von den Lysosomen). So kann auf diese Art und Weise bereits gut zwischen Lymphozyten (klein, kaum Granula), Monozyten (groß, kaum Granula) und neutrophilen Granulozyten (groß, viele Granula) unterschieden werden. Neben dem Streulicht gibt es außerdem noch Detektoren, die Fluoreszenzlicht messen können. Es gibt diverse Fluorochrome, die an die Antikörper gekoppelt sein können und Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Für diese Versuche wurden verwendet:



<b>Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper</b>	<b>Emissionsspektrum</b>
FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat)	519 nm
PE (Phycoerythrin)	578 nm
APC (Allophycocyanin)	660 nm

**Tabelle 19:** Fluorochrome mit Emissionsspektrum

Alle verwendeten Antikörper wurden von BD-Biosciences bezogen. Zur Färbung der untransfizierten Zellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen je Färbung gezählt (siehe 2.2.2) und 40  $\mu\text{l}$  Färbepuffer sowie 10  $\mu\text{l}$  Humanserum je Färbung dazugegeben. Die Röhrchen wurden für 10 bis 20 Min. bei  $4^\circ\text{C}$  in den Kühlschrank gestellt und danach für 5 Min. bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit 100  $\mu\text{l}$  Färbepuffer und eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wurde ausgeschüttet,  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Färbepuffer aufgenommen und in eine 96-well-Platte gegeben. Es wurden 2 bis 5  $\mu\text{l}$  Antikörper ( $1 \mu\text{g} / 10^6$  Zellen) in der entsprechenden Konzentration (siehe 2.1.5) dazugegeben und das Gemisch für 30 Min. in den Kühlschrank gestellt. Die Platte wurde nun zentrifugiert und in zwei Waschschriften mit zuerst 100  $\mu\text{l}$  und daraufhin 200  $\mu\text{l}$  Färbepuffer gewaschen. Die Zentrifugationen fanden bei  $4^\circ\text{C}$  statt. Für eine sofortige Messung wurde das Zellpellet in 300  $\mu\text{l}$  1-fach PBS resuspendiert. Soll die Messung erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden, musste das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  1-prozentigem PFA in PBS aufgenommen werden. Die Zellen hielten sich so ca. 1 Woche im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$ . Der Annexin V-PE Apoptose-Detektions-Assay ist eine spezielle durchflusszytometrische Untersuchung, die eine Aussage über Apoptosevorgänge in Zellen machen kann. Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden, die auf nukleären Veränderungen wie z.B. DNA-Fragmentierung beruhen, ist, dass auch früh-apoptotische Vorgänge erfasst werden können. Zu Beginn der Apoptose kommt es zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran der Zelle. Im Rahmen dessen werden Moleküle, die normalerweise an der Innenseite dieser Membran lokalisiert sind, an die Außenseite transloziert. Dabei handelt es sich in erster Linie um das Membranphospholipid Phosphatidyl-Serin. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für Phosphatidyl-Serin besitzt. Durch den Nachweis Annexin-markierter Zellen kann somit eine Aussage darüber gemacht werden, ob sich eine Zelle in früher Apoptose befindet. Um Annexin V in der Durchflusszytometrie

detektieren zu können, wird es an Fluorochrome gekoppelt. Da jedoch nicht nur früh-apoptotische Zellen einen Verlust der Membranintegrität aufweisen, sondern dieser auch in den späten Stadien des Zelltods (Nekrose) auftritt, wird zudem ein Vitalitätsmarker wie 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gemessen. Lebende Zellen sind 7-AAD negativ. Früh-apoptotische Zellen sind Annexin V positiv und 7-AAD negativ. In den Stadien später Apoptose wird auch 7-AAD positiv. Da dieser Test nur als Momentaufnahme durchgeführt wird, kann er einmalig durchgeführt nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Mehrfachmessungen über einen längeren Zeitraum können jedoch typische, zeitlich aufeinanderfolgende Markerkonstellationen für lebende Zellen, früh- und spät-apoptotische Zellen aufzeigen, und damit einen Hinweis auf apoptotische Vorgänge liefern.

### 2.2.12 SDS-Polycrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli 1970)

Proteinlösungen wurden in einer denaturierenden Gel-Elektrophorese auf vertikalen eindimensionalen Polycrylamid-Gelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einem 10- oder 12-prozentigem Trenngel und einem darüberliegenden Sammelgel. Für eine gute Auftrennung im großen Molekulargewichtsbereich wurden 10-prozentige Trenngele verwendet. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht dagegen wurden in 12-prozentigen Trenngelen aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele war wie folgt:

	<b>Trenngel</b>		<b>Sammelgel</b>
<b>Reagenzien</b>	10 %	12 %	
40 % Acrylamid / Bis (29:1)	4 ml	4,8 ml	787 µl
4-fach Puffer	4 ml	4 ml	1,75 ml
dH <sub>2</sub> O	8 ml	7,2 ml	4,46 ml
10 % APS	80 µl	80 µl	100 µl
Temed	8 µl	8 µl	8,4 µl

**Tabelle 20:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen

<b>Reagenzien</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH</b>	<b>Prozent</b>
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	pH 8.8	0,4 %
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl	pH 6.8	0,4 %
10 %-APS	10 % Ammonium-Persulfat in dH <sub>2</sub> O		

**Tabelle 21:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgelpuffer

Die Proben wurden in einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen kurz vor dem Auftragen für 5 Min. bei  $95^\circ\text{C}$  im Heizblock aufgeköcht. Nach dem Auftragen der Proben wurde 1-fach Laufpuffer in die Elektrophoresekammer gegossen, ein elektrisches Spannungsfeld angelegt und die Proben bei einer Spannung von 90 V entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der Proteine konnte anhand eines Größenstandards abgeschätzt werden.

<b>Reagenzien</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH</b>
5-fach Laufpuffer	0,125 M Tris, 0,76 M Glycin, 0,5 % SDS	pH 8.3
2-fach Laemmli Puffer	0,125 M Tris-HCl, 0,76 M Glycin, 0,5 % SDS	pH 8.3

**Tabelle 22:** Zusammensetzung der Laufpuffer

### 2.2.13 Western-Blot (nach Towbin 1979)

Die Detektion der nun aufgetrennten Proteine erfolgte durch einen Western-Blot. Dafür wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Polycrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert. PVDF-Membranen besitzen eine sehr hohe Bindekapazität für Proteine und eignen sich besonders gut für einen Nachweis durch Chemilumineszenz. Zunächst wurden Whatman-Blotting-Papiere entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten und jeweils vier von diesen kurz in 1-fach Transferpuffer (Zusammensetzung siehe unten) getränkt. Diese Papiere wurden nun auf die Semi-Dry-Blotkammer gelegt. Die auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde kurz in Methanol getaucht und auf die Whatman-Papiere gelegt. Es erfolgte die Herauslösung des Gels aus den Gelplatten und der Transfer auf die PVDF-Membran. Zum Abschluss wurden vier weitere Whatman-Papiere in 1-fach Transferpuffer getaucht und auf das Gel gelegt. Die Schichten wurden mit einem Spatel glatt gestrichen. Die Kammer wurde geschlossen und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Es wurde bei 20 V für 2 Std. geblottet. Die je Gel erforderliche Stromstärke in Ampere (A) berechnete sich folgendermaßen:

<b>Anzahl</b>	<b>Berechnung</b>
1 Gel	Länge x Breite x 2
2 Gele	Länge x Breite x 2 x 2

**Tabelle 23:** Stromstärke in Ampère

Nach Abschluss des Blots wurden die Membranen über Nacht in 5-prozentiger Magermilch (in TBST) auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen wegzufangen. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde ebenfalls in 5-prozentiger Magermilch durchgeführt. Folgende Tabelle gibt die Konzentrationen und Inkubationszeiten der verschiedenen Primärantikörper an:

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubationszeit</b>
H3	1:5000	1 Std.
HPRT	1:500	2 Std.
H3acetyl	1:5000	1 Std.
H3K27me3	1:5000	1 Std.
H3K4me3	1:2000	2 Std.
H3K9me3	1:1000	2 Std.
LSH	1:200	2 Std.
EZH2	1:200	2 Std.

**Tabelle 24:** Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Primärantikörper

Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen weggespült. Das Waschschaema setzte sich wie folgt zusammen: zweimal mit TBST für je 7 Min., einmal mit TBS für 10 Min.. Die Zusammensetzung von TBST und TBS wird weiter unten aufgeführt. Als Sekundärantikörper wurden HRP-gekoppelte anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 5-prozentiger Magermilch verwendet. Nach einer Inkubation von einer Stunde auf dem Schüttler wurden die nicht gebundenen Sekundärantikörper durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt (siehe oben). Zum Entwickeln wurde die Membran für 5 Min. in einer ECL-Lösung im Dunkeln inkubiert und daraufhin in einer Entwicklerkammer belichtet. Die Membranen können durch Reaktivierung wiederverwendet werden. Dafür wurde die Membran 5 Min. lang in Methanol gelegt, für 5 Min. in destilliertem Wasser inkubiert und für weitere 5 Min. in TBS gewaschen und eine Stunde in 5-prozentiger Magermilch inkubiert.

<b>Reagenzien</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH</b>
5-fach Transferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris	pH 8.3
10-fach TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl	pH 8.0
1-fach TBST	0,05 % Tween in 1-fach TBS	

**Tabelle 25:** Zusammensetzung der Waschpuffer

### 2.2.14 Immunfluoreszenz

Um die Suspensionszellen adhären zu machen, wurden  $3 \times 10^5$  Zellen für 24 Std. auf einer mit Poly-D-Lysin beschichteten 24-*well*-Platte in einem Volumen von 600  $\mu$ l Medium kultiviert. Die Ansätze sahen wie folgt aus:

2x Primärantikörper + Sekundärantikörper + DAPI
2x Primärantikörper + Sekundärantikörper ohne DAPI
2x Sekundärantikörper

**Tabelle 26:** Probenansätze für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Nach 24 Std. wurde das Medium vorsichtig mit einer Glas-Pasteur-Pipette abgesaugt, mit 1 ml 1-fach PBS gewaschen und mit 1 ml 4-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) versetzt. Die Platte wurde für 15 Min. auf Eis stehen gelassen. Das PFA wurde abgesaugt und die *wells* wurden fünfmal mit je 1 ml 1-fach PBS gewaschen. Zur Neutralisation wurden 500  $\mu$ l 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hinzugefügt und die *wells* erneut nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 ml 1-fach PBS gewaschen. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l 0,1-prozentigem Triton-X-100 permeabilisiert und 10 Min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Triton-X-Lösung abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit 5-prozentigem Humanserum für 30 Min. bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen wegzufangen. Nach Absaugen des Humanserums wurden die Zellen mit 300  $\mu$ l H3K9trimethyl-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper wurde 1:100 in Humanserum verdünnt und 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit 300  $\mu$ l humanem IgG benetzt worden waren. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Antikörper in drei Waschschritten mit je 1 ml 1-fach PBS entfernt. Die Detektion des Primärantikörpers wurde mit einem FITC-gekoppelten *goat anti-rabbit IgG*-Antikörper durchgeführt. Dieser wurde in einem Volumen von 300  $\mu$ l Humanserum 1:100 verdünnt, und vier Stunden bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer (oder in Alufolie gewickelt) auf den Zellen inkubiert. Nun folgte die Hintergrundfärbung mit DAPI. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und gehört zur Gruppe der Indol-Farbstoffe. Er wird für die Färbung von DNA eingesetzt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der

kleinen Furche der DNA an und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau (Emissionsmaximum bei 450 nm). Eine Interkalierung in GC-Basenpaare ist auch nachgewiesen. Nachdem die Stocklösung (1 mg / ml) mit dH<sub>2</sub>O hergestellt worden war, wurde DAPI in einer Konzentration von 100 ng / ml im Dunkeln auf die Zellen gegeben und für 5 Min. inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit je 1 ml 1-fach PBS gewaschen und sofort mit einem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Die Bilder wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Zur Kontrolle wurden auch die *wells* ohne DAPI-Färbung und ohne Primärantikörper-Inkubation aufgenommen.

### 2.2.15 Microarray-Analyse

Für eine genomweite Expressionsanalyse wurden *Gene Chip Human Gene 1.0 ST Arrays* (Affymetrix) verwendet (Datasheet). Dieses DNA-Microarray-Set erfasst 28.869 bekannte humane Gene mit 764.885 Proben. Jedes Gen wird durch rund 26 Proben, die über die gesamte Länge des jeweiligen Gens verteilt sind, repräsentiert. Dieses Verfahren macht, im Gegensatz zu den 3'-basierten Expressions-Arrays, eine spezifischere Detektion der Genexpression möglich. Die genspezifischen Oligonukleotide von bis zu 25 Basenpaaren werden durch ein photolithographisches Verfahren direkt auf der Chip-Oberfläche synthetisiert. Im Gegensatz zu anderen Arrays (z.B. HG-U133A) verwenden diese Arrays nur *perfect match*-Sonden. Standard Poly-A-Kontrollen und Hybridisierungskontrollen dienen der Fehlersuche und der Detektion unspezifischer Bindungen während des Hybridisierungsprozesses. Ausgehend von einer Gesamt-RNA von mindestens 5 µg wird im ersten Schritt unter Verwendung einer reversen Transkriptase und einer E. coli-DNA-Polymerase-I doppelsträngige cDNA synthetisiert. Nach einem Aufreinigungsschritt mit 96- bis 100-prozentigem Ethanol produziert die T7-RNA-Polymerase in der anschließenden *in vitro* Transkription (IVT) aus einem Mix biotinylierter Ribonukleotide komplementäre, biotinylierte cRNA. Im Gegensatz zur cDNA-Synthese kommt es hierbei zu einer 100- bis 200-fachen Amplifikation, da ein cDNA-Molekül mehrere Male als Matrize dienen kann. Die cRNA wird aufgereinigt, durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotiden fragmentiert und für 16 Stunden bei 45°C und 60 U / Min. in einem Hybridisierungscocktail auf die DNA-Microarrays

hybridisiert. Danach werden die Arrays gewaschen, mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex (SAPE) gefärbt und gescannt. Voraussetzung für die Genexpressionsanalyse ist die Linearität aller experimentellen Schritte. Ist dies erfüllt, gilt auch der lineare Zusammenhang: das detektierte Fluoreszenzsignal ist umso größer, je stärker die Expression eines Gens ist (Freeman, W.M. et al., 2000). Durch die resultierende Photonenemission der fluoreszenzmarkierten und hybridisierten cRNA wird von der Affymetrix-Software (*Microarray Analysis Suite 5.0 Software*) ein Bild erstellt und dieses Lichtsignal in einen 16-Bit-Intensitätswert übersetzt. Diese Bilder stellen die Rohdaten eines jeden Scans dar. Somit wird am Ende des Scans eine Liste aller auf dem Array vorhandenen SONDENSÄTZE erstellt und neben dem Signalwert angegeben, ob das Gen exprimiert (*present call*) oder nicht exprimiert (*absent call*) wird (*detection call*). Die Auswertung der Scan-Ergebnisse beginnt zum Ausschluss exogener Störgrößen mit der sogenannten Normalisierung. Dieser Schritt ist notwendig, um Hintergrundsignale vom Array-Signal abzuziehen, Rohwerte auf eine Kontrolle beziehen zu können und die Signifikanz zu berechnen. Daraufhin werden Exel-Datensätze mit der relativen Expression der untersuchten Gene für die einzelnen Proben erstellt. Sich anschließende Cluster-Analysen und die *Principal Component-Analyse* (PCA) wurden mit einer speziellen Software durchgeführt. Hierarchisches Clustering dient dazu, Gene mit ähnlicher Expression einer gemeinsamen Gruppe zuordnen zu können. Die Identifikation differenziell exprimierter Gene wurde mit einer Signifikanzanalyse für Microarrays (SAM) (Tusher, V.G. et al., 2001) ermittelt. Um Gene zu finden, die möglicherweise für die Klassifikation von Proben als maligne oder gesund herangezogen werden könnten, wurden Prädiktionsanalysen (PAM) (Efron, B. et al., 2002) durchgeführt. Letztendlich wurde eine *Heat-Map* der differenziell exprimierten Gene erstellt. Hierin bedeutet eine rote Markierung die Überexpression eines Gens, wohingegen grün die Herunterregulation eines Gens darstellt. Folgende Proben wurden auf ihre differenzielle Genexpression hin untersucht:

697	Neg-siRNA	siHELLES_7	siSOX4_1	siSOX4_2	DMSO	TSA
Nalm6	Neg-siRNA	siHELLES_5	siHELLES_7	siSOX4_1	DMSO	TSA

**Tabelle 27:** Proben für die Microarray-Analyse

Die Isolierung und Qualitätsbestimmung der RNA (siehe 2.2.4) wurde im Labor Dr. Richter durchgeführt. Darauf folgende Arbeitsschritte bis zum Scannen der Proben fanden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (München) statt. Die Auswertung der Expressionssignale wurde sowohl von oben erwähntem Institut als auch von Herrn PD. Dr. G. Richter vorgenommen.



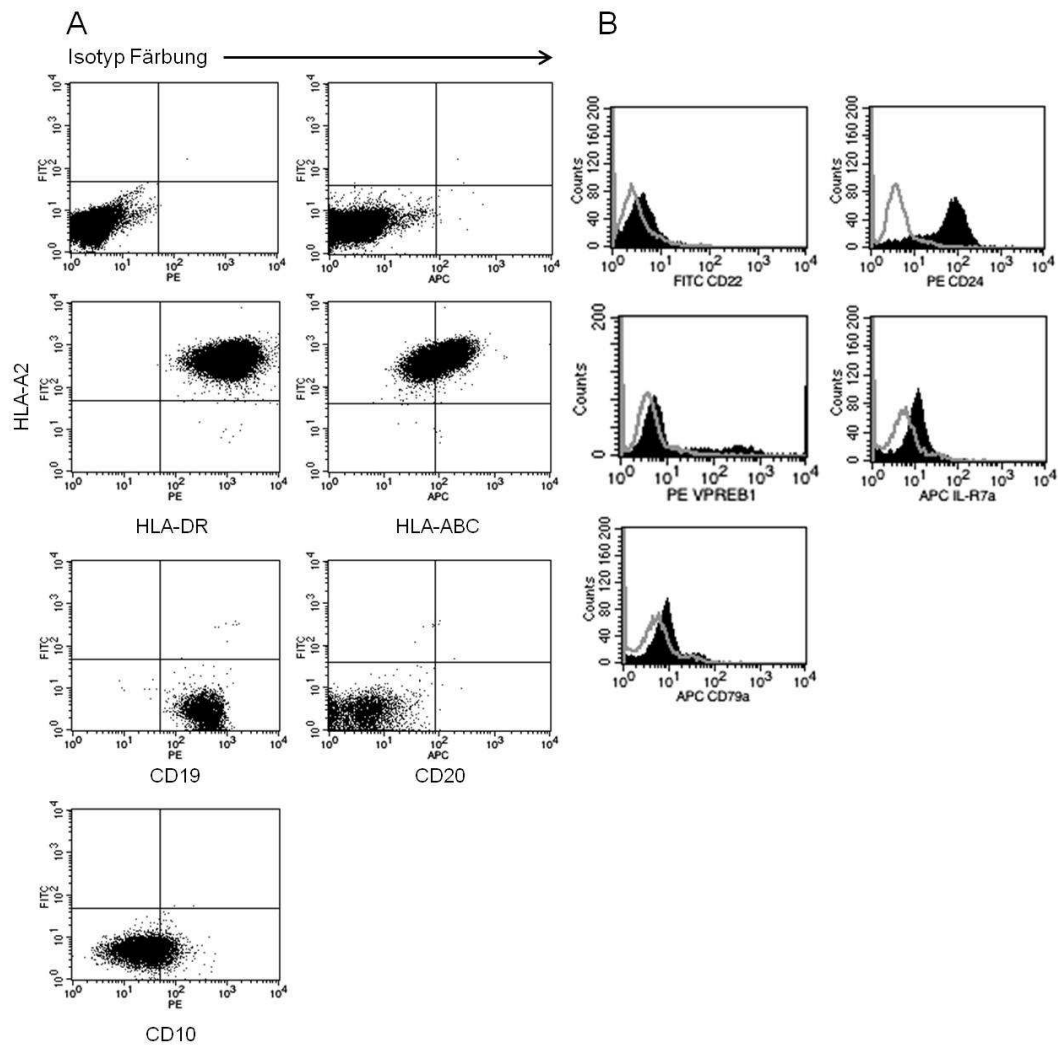
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen der Zelllinien 697 und Nalm6

Für alle Versuche wurden die Vorläufer-B-Zell-Leukämie-Zelllinien 697 und Nalm6 verwendet. Im ersten Experiment wurde geklärt, ob sich Zelllinienzellen und cALL-Zellen in einem vergleichbaren Differenzierungsstadium befinden. Das Expressionsprofil von cALL-Zellen ist gut untersucht (Tabelle 1). Es wurden untransfizierte Zellen beider Zelllinien mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.2.11) auf die Expression der wichtigsten cALL-Oberflächenmarker hin untersucht. Abbildung 4 zeigt in Dot-Plots und Histogrammen, dass die Membranproteine CD10, CD19, HLA-DR und CD79a, die von den cALL-Zellen obligat exprimiert werden, in unterschiedlicher Expressionsstärke auch auf den Zelllinienzellen zu finden waren. Von den fakultativ exprimierten Oberflächenmarkern HLA-A2, HLA-ABC, CD20, CD22, CD24, IL7RA und VPRED1 wurden HLA-A2, HLA-ABC und CD24 stark, IL7RA schwach und CD22, CD20 und VPRED1 sehr schwach oder gar nicht exprimiert. Tabelle 28 veranschaulicht die Expressionsstärke des jeweiligen Antigens als Zunahme der *relative brightness* im Vergleich zur Isotypkontrolle. Der obligat exprimierte Marker CD45 wurde in diesem Experiment nicht untersucht, da er allen hämatopoetischen Zellen zu eigen ist (*leukocyte common antigen*, LCA). Dargestellt werden die Ergebnisse von 697-Zellen, Nalm6-Zellen zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die fehlende Expression von CD20 erklärt sich dadurch, dass es durch Inhibition der B-Zelldifferenzierung zu keiner CD20-Expression kommt. Das Oberflächenexpressionsprofil der Zelllinienzellen (wenig membranständiges CD22 und VPRED1) lässt darauf rückschließen, dass sich die Zelllinienzellen überwiegend in einem pro-B-Zell-Stadium befinden. Sie befinden sich damit in einem sehr ähnlichen Differenzierungsstadium wie cALL-Zellen.

Antigen	Expressionsstärke
HLA-DR	20689,5
CD10	1529
CD19	482,5
CD79A	5,2
HLA-ABC	1842,9
HLA-A2	13790
CD24	83,9
IL7RA	19,0
VPREB1	3,19
CD22	2,9
CD20	0,31

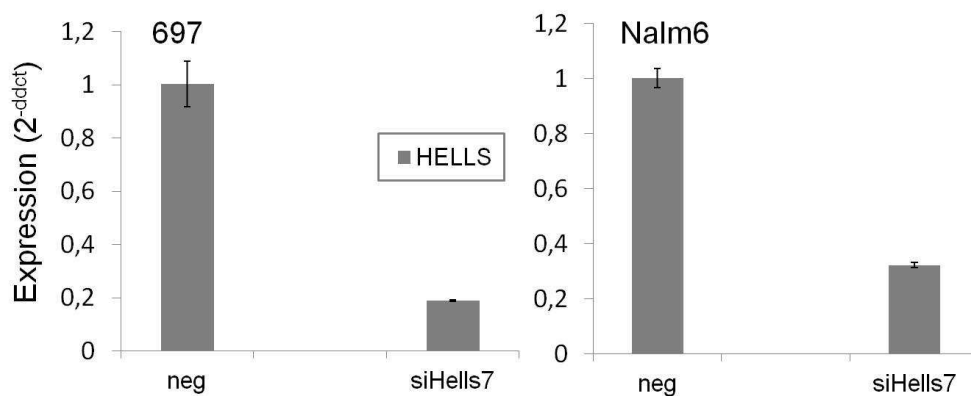
**Tabelle 28:** Expressionsstärke der Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie von untransfizierten 697-Zellen (dargestellt als Zunahme der *relative brightness* im Vergleich zur Isotypkontrolle)



**Abbildung 4:** Durchflusszytometrie von untransfizierten 697-Zellen **A** Dot-Plots **B** Histogramme

### 3.2 HELLS beeinflusst Apoptose nicht

Der Annexin V-PE-Apoptose-Detektions-Assay wurde mit transient-supprimierten HELLS-Zellen und Kontrollzellen durchgeführt. In 697-Zellen gelang eine HELLS-Suppression auf 19%, in Nalm6-Zellen auf 32% (Abbildung 5). Am effektivsten gelangen die HELLS-Suppressionen mit der siRNA HELLS\_7, daher werden die transient-supprimierten HELLS-Zellen im Folgenden mit siHELLS7 betitelt. Als Kontrollzellen dienten mit Negativ-siRNA transfizierte Zellen (negativ).

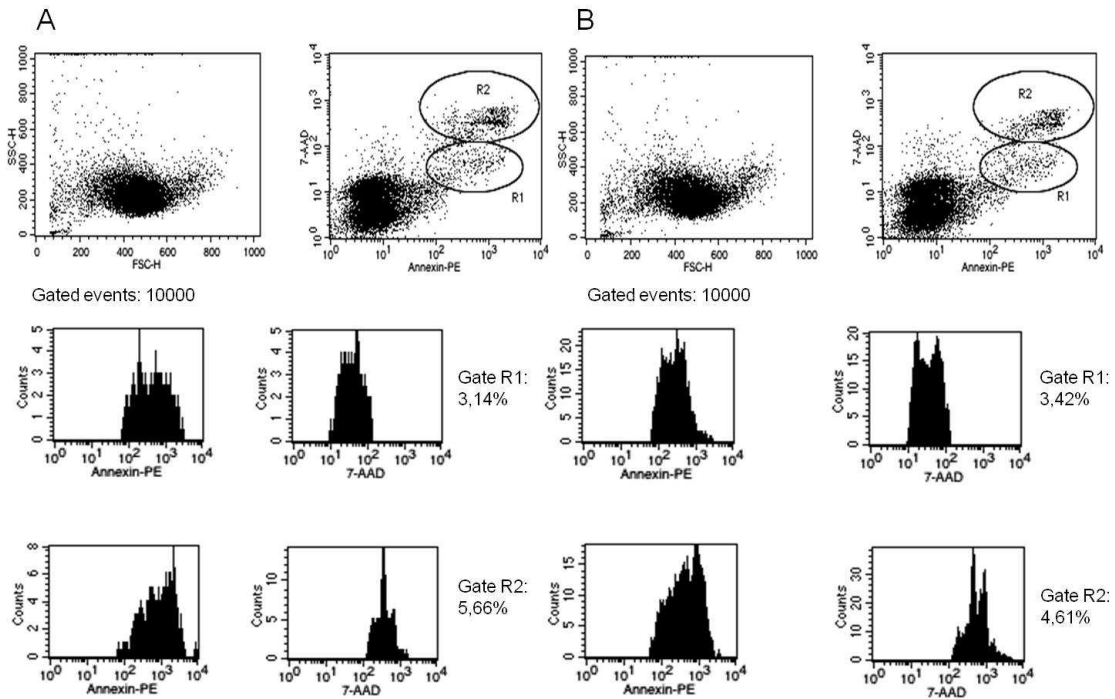


**Abbildung 5:** Transiente HELLS-Suppression für Apoptose-Assay und Western-Blot-Untersuchungen in 697- und Nalm6-Zellen

Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen wurden mit Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt (siehe 2.2.11) und im Durchflusszytometer gemessen. Neben einem generell niedrigen Prozentsatz an apoptotischen Zellen in beiden Probenansätzen (Negativ: 8,8 %, siHELLS7: 8,0 %) fand sich zudem kein wesentlicher Unterschied in der Verteilung früh- bzw. spät-apoptotischer Zellen zwischen Kontrollzellen und supprimierten HELLS-Zellen. Tabelle 29 veranschaulicht den Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den gemessenen Zellen. *Gated events* (GE) und *total events* (TE) waren jeweils 10.000 Zellen. In beiden Zelllinien wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt, gezeigt werden nur die Ergebnisse von 697-Zellen (Abbildung 6).

697	Negativ		siHELLS7	
	Events	(%)	Events	(%)
Früh-apoptotische Zellen	314	3,14	342	3,42
Spät-apoptotische Zellen	566	5,66	461	4,61

**Tabelle 29:** Anteil der apoptotischen Zellen in Kontrollzellen und supprimierten HELLS-Zellen

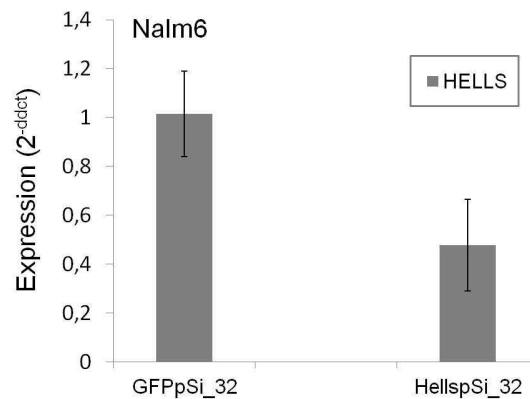


**Abbildung 6:** Annexin V-PE Apoptose-Detektions-Assay von 697-Zellen **A** Kontrollzellen, Gate 1: früh-apoptotische Zellen, Gate 2: spät-apoptotische Zellen **B** Transient-supprimierte HELLS-Zellen, Gate 1: früh-apoptotische Zellen, Gate 2: spät-apoptotische Zellen

### 3.3 Überexpression von HELLS hemmt kontaktunabhängiges Wachstum

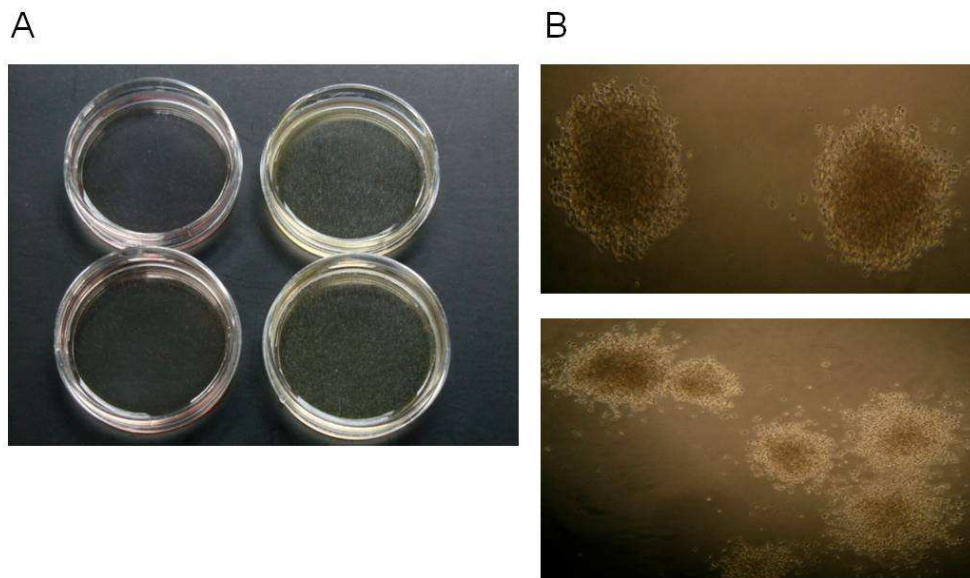
Im Rahmen eines Methylzellulose-Assays (siehe 2.2.10) wurde untersucht, ob HELLS Einfluss auf kontaktunabhängiges Wachstum hat. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für Tumorzellen. Da sich Leukämiezellen bereits in flüssiger Umgebung befinden benötigen sie naturgemäß keine Kontaktflächen, um expandieren zu können. Es war also von vornherein zu erwarten, dass sowohl Kontrollzellen als auch supprimierte HELLS-Zellen in diesem Medium wachsen würden. Da sich ein Versuchsansatz über zwei Wochen erstreckte, mussten die supprimierten HELLS-Zellen

konstitutiv-herunterreguliert sein. Die Zellen wurden mittels des pSIREN-Vektorsystems hergestellt (siehe 2.2.9). Es wurde die siRNA HELLS\_7 verwendet. Eine suffiziente, reproduzierbare HELLS-Suppression wurde nur in Nalm6-Zellen erzielt. 697-Zellen starben im Laufe des Herstellungsprozesses oder zeigten keine verlässliche HELLS-Suppression. Die effektivste HELLS-Suppression zeigte der Klon HELLS\_32 (Suppression auf 48 %, Abbildung 7). Als Kontrollzellen dienten nur mit GFP-transfizierte Zellen. Die konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen werden im Western-Blot im Folgenden mit Hells7 betitelt.



**Abbildung 7:** Konstitutive HELLS-Suppression für Methylzellulose-Assay und Western-Blot-Untersuchungen in Nalm6-Zellen

Es wurden je  $5 \times 10^3$  Zellen auf Agarplatten ausplattiert und für 14 bis 16 Tage im Brutschrank bebrütet (siehe 2.2.10). Wie erwartet, waren in beiden Versuchsansätzen Kolonien nachzuweisen. Interessanterweise konnten die supprimierten HELLS-Zellen jedoch besser proliferieren als die Kontrollzellen und bildeten mehr und engere Kolonien. Abbildung 8 stellt Ergebnisse einer Versuchsreihe dar. Die Ergebnisse konnten insgesamt dreimal gezeigt werden.



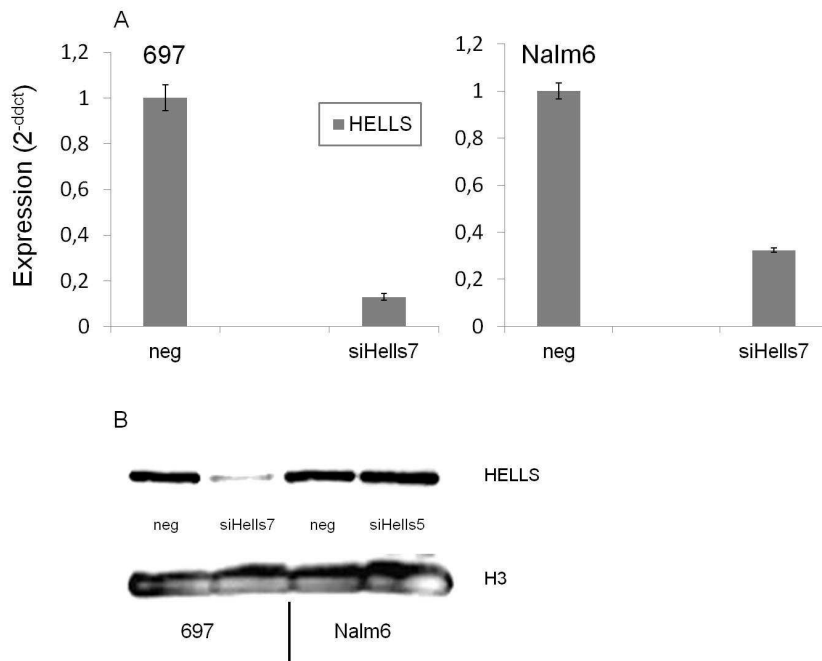
**Abbildung 8:** Methylzellulose-Assay mit konstitutiv-supprimierten Nalm6-Zellen und Kontrollzellen **A** Links: GFP-Kontrollzellen, rechts: konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen **B** Oben: GFP-Kontrollzellen, unten: konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen

#### 3.4 HELLS beeinflusst die H3-Acetylierung nicht

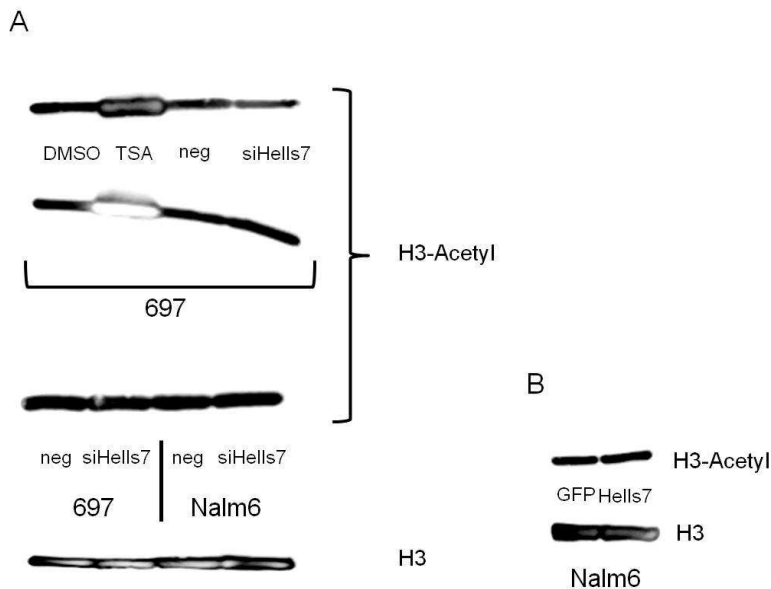
Die nachfolgenden Versuche sollten klären, ob HELLS in cALL-Zellen als epigenetischer Regulator wirkt. Dafür wurden posttranslationale Histonveränderungen in Western-Blot-Experimenten untersucht. Die Arbeitsgruppe Myant et al. zeigte, dass HELLS in Kolonkarzinom-Zelllinien-Zellen (HCT116) und supprimierten DNMT-Zellen (DNMT1-KO, DNMT3B-KO) den Transport von DNA-Methyltransferasen (DNMT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) an zu reprimierendes Chromatin bewirkt (Abbildung 9) (Myant, K. et al., 2008).



### 3 Ergebnisse



**Abbildung 10:** HELLs-Suppression für Western-Blot-Untersuchungen in transient-supprimierten 697- und Nalm6-Zellen **A** qRT-PCR **B** Western-Blot, *net intensity* 0,23 (697)

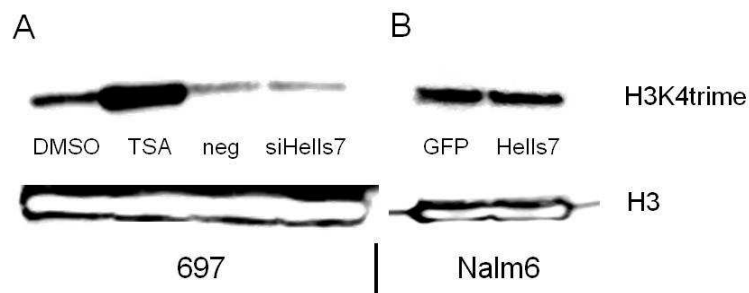


**Abbildung 11:** Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen **A** Untransfizierte Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (*net intensity* 0,78 bzw. 0,77) **B** GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen



### 3.5 HELLS beeinflusst die H3K4-Trimethylierung nicht

Neben der Beteiligung an der Rekrutierung von Histon-Deacetylasen ans Chromatin (Myant, K. et al., 2008) wirkt HELLS laut Yan et al. zudem an der H3K4-Trimethylierung mit. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass  $LSH^{-/-}$ -Mäuse eine gesteigerte H3K4-Trimethylierung an perizentromeren Sequenzen besitzen (Yan, Q. et al., 2003). Um dies in den Zelllinien-Zellen zu untersuchen, wurden weitere Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Neben transient-supprimierten HELLS-Zellen (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10) wurden erneut auch konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7) eingesetzt. Der H3K4-Trimethyl-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 verwendet. Da Histon-Acetylierung und H3K4-Trimethylierung synergistisch wirken, war zu erwarten, dass TSA-vorbehandelte Zellen neben einer erhöhten H3-Acetylierung auch eine erhöhte H3K4-Trimethylierung aufweisen. Daher wurden erneut zusätzlich untransfizierte 697-Zellen, die mit TSA oder Lösungsmittelkontrolle vorbehandelt worden waren, als Positiv- bzw. Negativkontrollen eingesetzt. Abbildung 12 zeigt Ergebnisse von 697- und Nalm6-Zellen. Tatsächlich wurde in den TSA-vorbehandelten untransfizierten Zellen eine gesteigerte H3K4-Trimethylierung nachgewiesen. Dagegen zeigte sich weder in den transient- noch in den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen eine Veränderung des H3K4-Trimethylierungsstatus im Vergleich zu den Kontrollzellen.

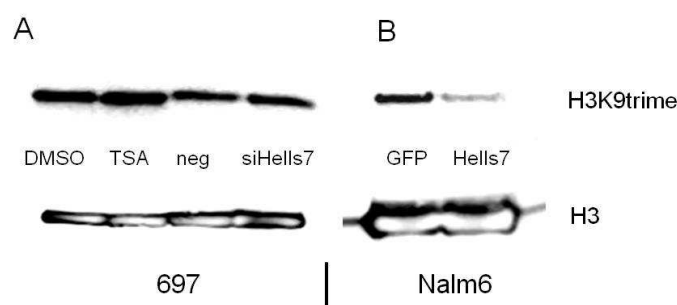


**Abbildung 12:** Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen **A** Untransfizierte 697-Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697) **B** GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, *net intensity* 0,95)

### 3.6 HELLS fördert die H3K9-Trimethylierung

#### 3.6.1 Western-Blot

Yan et al. postulierten desweiteren, dass die H3K9-Trimethylierung durch HELLS nicht beeinflusst wird (Yan, Q. et al., 2003). Zur Prüfung dieses Sachverhalts, wurden in Western-Blot-Untersuchungen erneut transient- (697) und konstitutiv- suppressierte HELLS-Zellen (Nalm6) untersucht. Die HELLS-Suppression war zuvor in qRT-PCR-Untersuchungen quantifiziert worden (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10; Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7). Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden TSA- und DMSO-vorbehandelte untransfizierte Zellen eingesetzt. Histon-Acetylierung und H3K9-Trimethylierung wirken im Gegensatz zur H3K4-Trimethylierung nicht synergistisch. TSA-Behandlung hatte demzufolge keinen Einfluss auf die H3K9-Trimethylierung. Auch in den transient-supprimierten HELLS-Zellen (697) wurde keine Veränderung der H3K9-Trimethylierung festgestellt. Dagegen aber zeigte sich in den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (Nalm6) eine deutliche Abnahme der H3K9-Trimethylierung (Abbildung 13). Da Änderungen der Histon-Modifikationen Änderungen der Genexpression, Transkription und Translation nach sich ziehen, werden Veränderungen in der Zelle erst mit einer gewissen Latenz sichtbar. Diese Veränderungen waren in den transient-supprimierten HELLS-Zellen nach 48 Stunden (48 Std.-Assay) noch nicht nachweisbar.



**Abbildung 13:** Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen **A** Untransfizierte 697-Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Negativkontrollen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697) **B** GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, *net intensity* 0,30)

### 3.6.2 qRT-PCR

Um herauszufinden, warum die H3K9-Trimethylierung in den supprimierten HELLS-Zellen erniedrigt ist, wurde die Expression der Methyltransferase SUV39H1 in Kontrollzellen und transient- bzw. konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen in qRT-PCR-Versuchen untersucht. SUV39H1 ist eine H3-spezifische Methyltransferase, die selektiv das Lysin 9 am N-Terminus von H3 methyliert (Rea, S. et al., 2000). Es wurde sowohl in den transient- als auch in den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (697, HELLS-Suppression auf 13 %, Abbildung 10; Nalm6, HELLS-Suppression auf 48%, Abbildung 7) eine im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen signifikante Verminderung der SUV39H1-Expression nachgewiesen (697, Suppression auf 54 %; Nalm6, Suppression auf 46 %, Abbildung 14).

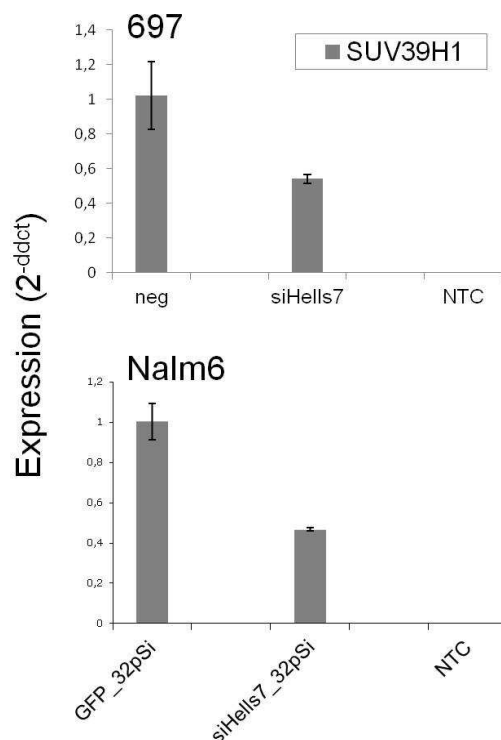
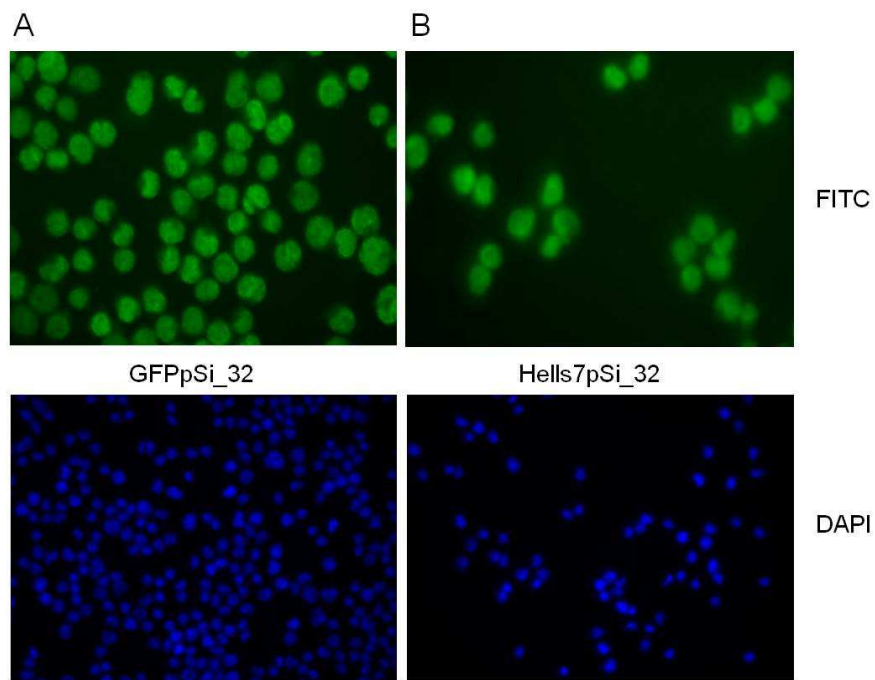


Abbildung 14: Expression von SUV39H1 in 697- und Nalm6-Zellen

### 3.6.3 Immunfluoreszenz

Um den Einfluss von HELLS auf die H3K9-Trimethylierung in einem weiteren Experiment zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. Es wurden GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7) in einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen mit dem polyklonalen H3K9-Trimethyl-Antikörper (Konzentration 1:1000) gefärbt (siehe 2.2.14). Um sicherzustellen, dass der Antikörper im Zellkern bindet, wurde zusätzlich eine DAPI-Hintergrundfärbung durchgeführt (siehe 2.2.14). DAPI-gefärbte DNA leuchtet blau. Dagegen fluoresziert der FITC-gekoppelte Sekundär-Antikörper grün. Da das zur Verfügung stehende Fluoreszenzmikroskop nur eine maximal 40-fache Vergrößerung besaß, ließ sich keine eindeutige Aussage über Quantität und Verteilung der Fluoreszenz machen. Abbildung 15 veranschaulicht die Ergebnisse.

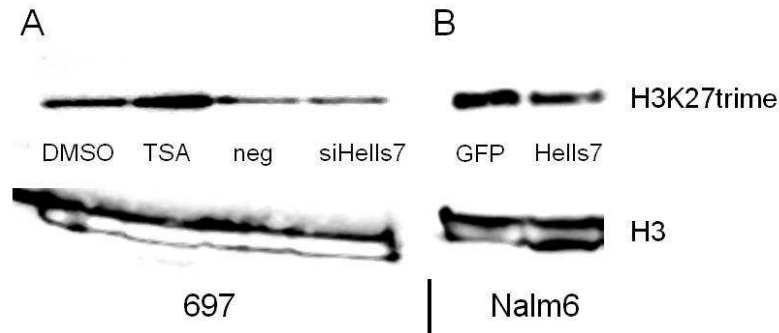


**Abbildung 15:** Immunfluoreszenz-Färbung von GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierten Nalm6-Zellen auf H3K9-Trimethylierung (FITC, grün), DAPI-Kernfärbung (blau) **A** GFP-Kontrollzellen **B** Konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen

### **3.7 HELLS beeinflusst die H3K27-Trimethylierung möglicherweise über die Regulation von EZH2**

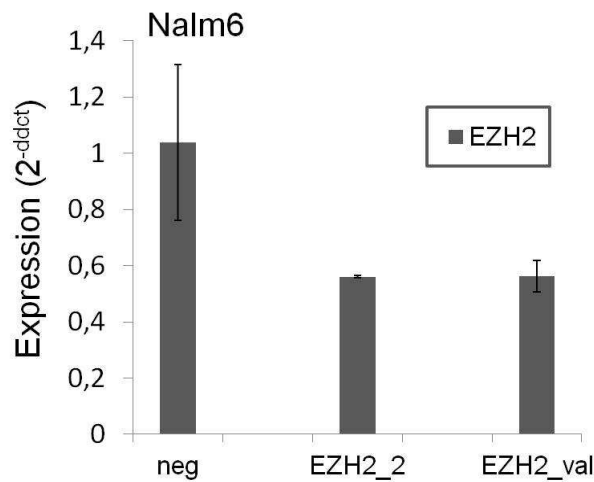
Die H3K27-Trimethylierung stellt neben der H3K9-Trimethylierung eine weitere wichtige Histon-Modifikation dar, die die Genexpression supprimiert. Der Repressionsmechanismus über die H3K27-Trimethylierung unterscheidet sich jedoch von dem der H3K9-Trimethylierung. Während die H3K9-Trimethylierung durch die Methyltransferase SUV39H1 vermittelt wird, wird das Lysin 27 am Histon 3 von einem Multienzymkomplex, dem Polycomb-Repressions-Komplex-2 (PRC2), methyliert. Der PRC2-Komplex besteht u.a. aus dem Protein *enhancer of zeste 2* (EZH2), das eine Domäne für die Methyltransferaseaktivität dieses Komplexes besitzt. Es ist bekannt, dass EZH2 als Mitglied des PRC2-Proteinkomplexes mittels H3K27-Trimethylierung Differenzierungsprozesse supprimiert (Xi, S. et al., 2007). Potentielle Zielgene sind Gene des Hox-Clusters. Tumorzellen können diese Mechanismen missbrauchen, um Differenzierungsgene zu supprimieren. Verschiedene Arbeitsgruppen vermuten eine Verknüpfung der beiden unterschiedlichen Repressionsmechanismen (Xi, S. et al., 2007; Tao, Y. et al., 2010). Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde zunächst der H3K27-Trimethylierungsstatus in transient- bzw. konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (697 und Nalm6) und Kontrollzellen untersucht. Es wurde jeweils eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und die HELLS-Suppression zuvor in qRT-PCR-Untersuchungen überprüft (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10; Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7). Auch bei diesen Versuchen wurden TSA- und DMSO-vorbehandelte untransfizierte Zellen als Positiv- bzw. Negativkontrollen eingesetzt. Da auch Histon-Acetylierung und H3K27-Trimethylierung nicht synergistisch wirken, war zu erwarten, dass TSA-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die H3K27-Trimethylierung besitzt. Abbildung 16A veranschaulicht, dass es in den transient-supprimierten HELLS-Zellen (697) zu keiner Beeinflussung der H3K27-Trimethylierung im Vergleich zu den Kontrollzellen kam. In den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (Nalm6) dagegen zeigte sich eine verminderte H3K27-Trimethylierung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 16B). Eine genaue Quantifizierung war jedoch nicht möglich, da die *net intensity* in diesem Fall

nicht messbar war. Die *net intensity* beschreibt die Zu- bzw. Abnahme der Bandendichte im Western-Blot im Vergleich zur Negativkontrolle.



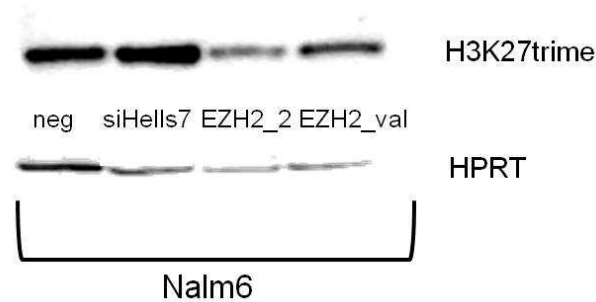
**Abbildung 16:** Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen **A** Untransfizierte Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697, *net intensity* 0,85) **B** GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6)

Um zu zeigen, dass EZH2 die H3K27-Trimethylierung auch in pädiatrischen Leukämiezellen beeinflusst, wurden Nalm6-Zellen nach transientser EZH2-Suppression auf das H3K27-Trimethylierungsmuster hin untersucht. Die bestmögliche EZH2-Suppression gelang auf 56 % (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** EZH2-Suppression (Nalm6)

Kontrollzellen, transient-supprimierte EZH2-Zellen beider verwendeter siRNAs (Suppression auf 56%) und transient-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, Suppression auf 32%, Abbildung 5) wurden daraufhin auf das H3K27-Trimethylierungsmuster hin untersucht. Abbildung 18 bestätigt eine deutliche Verminderung der H3K27-Trimethylierung in den supprimierten EZH2-Zellen, nicht aber in den transient-supprimierten HELLS-Zellen, wie bereits in Abbildung 16A gezeigt.



**Abbildung 18:** Western-Blot von Nalm6-Zellen; Kontrollzellen, transient-supprimierte HELLS-Zellen und transient-supprimierte EZH2-Zellen (EZH2\_2: *net intensity* 0,37)

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass EZH2-vermittelte H3K27-Trimethylierung in cALL-Zellen durch HELLS reguliert wird. Bereits in früheren Experimenten der AG Richter wurde gezeigt, dass EZH2 im Vergleich zu normalen Körperzellen in cALL-Zellen hoch exprimiert wird (Abbildung 19). Um das Expressionsverhalten von EZH2 in den Zelllinienzellen zu untersuchen, wurde in transient- bzw. konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10; Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7) und Kontrollzellen in qRT-PCR-Untersuchungen die Expression von EZH2 untersucht. Tatsächlich wurde in beiden Zelllinienzellen ein deutlicher Abfall der EZH2-Expression in den supprimierten HELLS-Zellen nachgewiesen (697, Suppression auf 10%; Nalm6, Suppression auf 63%, Abbildung 20).

### 3 Ergebnisse

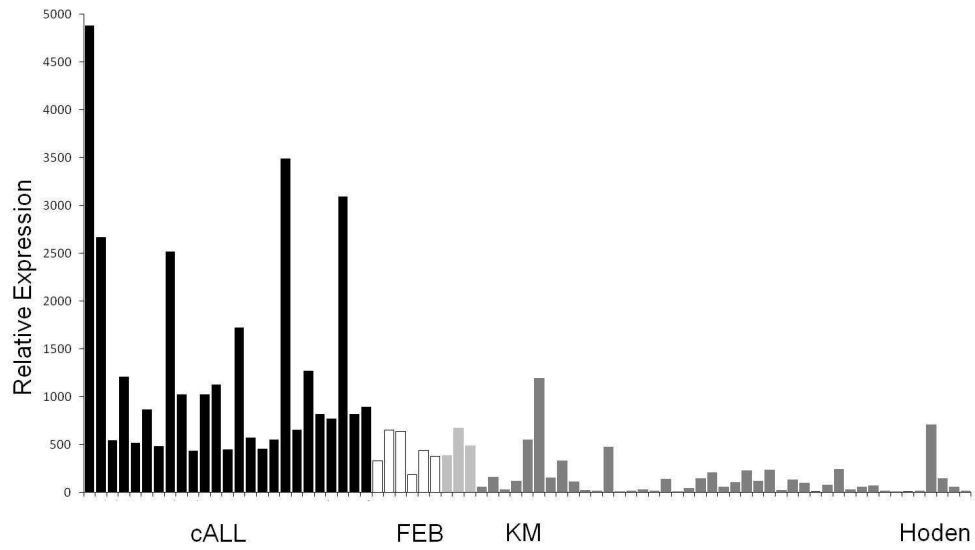


Abbildung 19: EZH2-Expression in verschiedenen Geweben

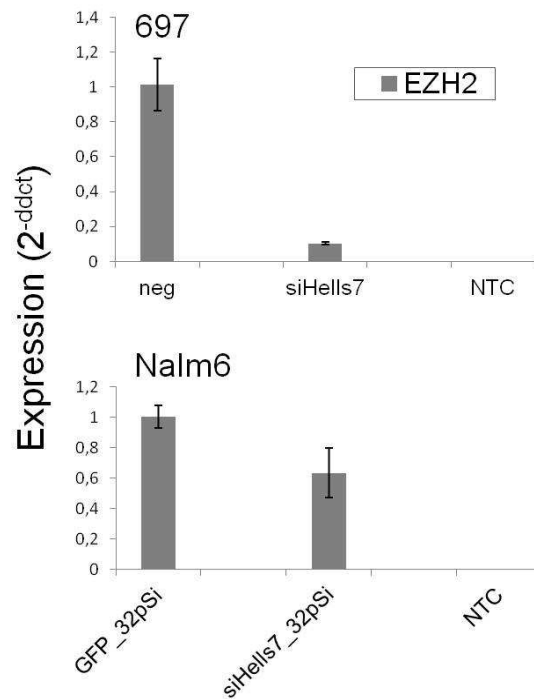
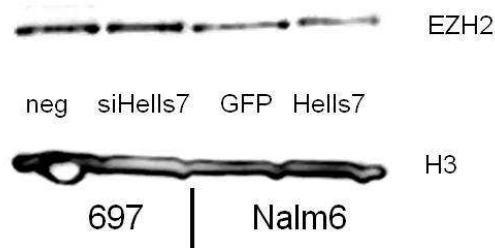


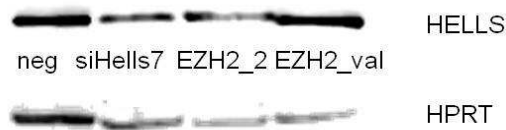
Abbildung 20: Expression von EZH2 in 697- und Nalm6-Zellen **oben:** transient-supprimierte HELLS-Zellen (697), **unten:** konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6)



Um die Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurde die EZH2-Expression in Kontrollzellen und transient- bzw. konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen in Western-Blot-Untersuchungen untersucht (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10; Nalm6, Suppression auf 48%, Abbildung 7). Es wurde allerdings keine signifikante Veränderung der EZH2-Proteinexpression nachgewiesen (Abbildung 21). Dagegen fiel eine deutliche Verminderung der HELLS-Expression in den transient-supprimierten EZH2-Zellen (Nalm6, Suppression auf 56%, Abbildung 17) auf (Abbildung 22). Zur besseren Vergleichbarkeit wird daneben die supprimierte HELLS-Expression in den transient-supprimierten HELLS-Zellen (Nalm6, Suppression auf 32%, Abbildung 5) gezeigt.



**Abbildung 21:** Western-Blot von transient-supprimierten HELLS-Zellen (697) und konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (Nalm6), *net intensity* 0,93 (697) bzw. 0,72 (Nalm6)

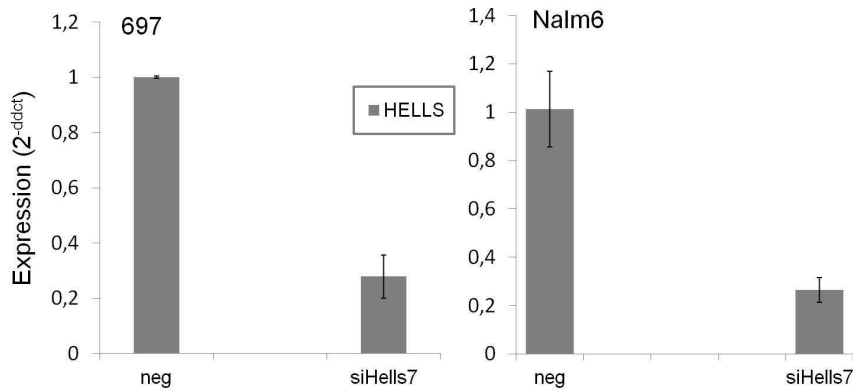


**Abbildung 22:** Western-Blot transient-supprimierter HELLS- und EZH2-Zellen (Nalm6), *net intensity* HELLS7: 0,35, EZH2\_2: 0,34

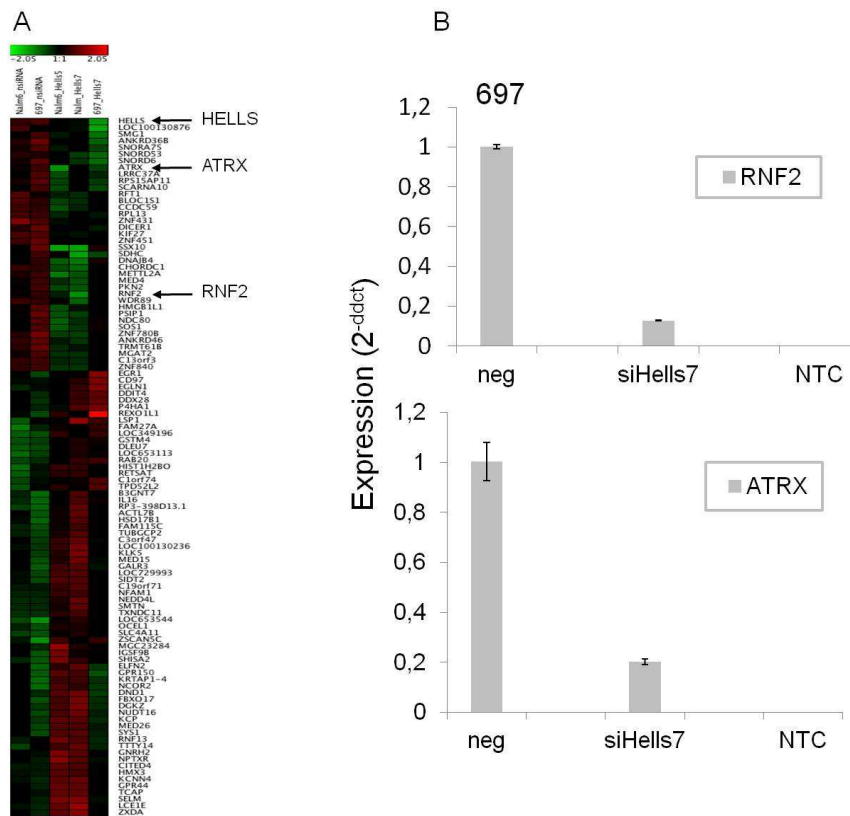
#### **3.8 HELLS hemmt Differenzierung**

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente lassen die Vermutung aufkommen, dass HELLS über die Förderung von H3K9-Trimethylierung und H3K27-Trimethylierung die Repression bestimmter Gene in pädiatrischen cALL-Zellen bewirkt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass HELLS diesen epigenetischen Mechanismus dazu verwendet, Differenzierungsgene zu reprimieren. Um potentielle Gene zu identifizieren, die durch HELLS reguliert sein könnten, wurde eine Microarray-Analyse von Kontrollzellen und transient-supprimierten HELLS-Zellen beider Zelllinien durchgeführt (697, Suppression auf 28% Nalm6, Suppression auf 26%, Abbildung 23). Es wurde mindestens 5 µg hochaufgereinigte RNA über die Trizol-Methode (siehe 2.2.4.2) gewonnen und an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (München) zur Weiterverarbeitung versendet. Dort wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und auf *Gene Chip Human Gene 1.0 ST Arrays* (Affymetrix) hybridisiert (siehe 2.2.15). Es wurden mehrere Gene identifiziert, die in den supprimierten HELLS-Zellen signifikant gegenüber den Kontrollzellen vermindert exprimiert wurden (Abbildung 24A). Darunter fanden sich auch zwei Gene, die eine Rolle bei der Suppression von Differenzierungsprozessen spielen. Dies waren die Gene RNF2 und ATRX. RNF2 ist Teil des PRC1L-Komplexes, der in die Repression von Differenzierungsgenen durch den PRC-Komplex involviert ist und zusammen mit EZH2 genomisch geprägte Gene (*imprinted genes*) während der Embryogenese reprimiert (Terranova, R. et al., 2008). ATRX besitzt als Mitglied der SNF2-Familie eine Helikasedomäne und Attribute eines Transkriptionsfaktors und ist wie HELLS an der Genregulation des perizentromeren Heterochromatins durch Chromatin-Umbildung beteiligt. Eine Interaktion mit EZH2 wird in der Literatur beschrieben (Cardoso, C. et al., 1998). Um die differenzielle Expression dieser Gene zu verifizieren, wurden qRT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Untersucht wurden transient-supprimierte HELLS-Zellen beider Zelllinien (697, Suppression auf 13%, Abbildung 10; Nalm6, Suppression auf 26%, Abbildung 23). Abbildung 24B bestätigt eine signifikante Expressionsverminderung beider Gene in den supprimierten HELLS-Zellen (697, Suppression von RNF2 auf 13 %, von ATRX auf 20 %). In Nalm6-Zellen wurden keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 23:** Transiente HELLS-Suppression für Microarray-Untersuchungen in 697- und Nalm6-Zellen



**Abbildung 24:** Differenzielle Expression in transient-supprimierten 697- und Nalm6-Zellen **A** Heat-Map Spalte 1: Nalm6-Kontrollzellen, Spalte 2: 697-Kontrollzellen, Spalte 3: Nalm6-siHELLs5, Spalte 4: Nalm6-siHELLs7, Spalte 5: 697-siHELLs7, grün = verminderte Expression, rot = erhöhte Expression **B** qRT-PCR zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse, Expression von RNF2 und ATRX in 697-Zellen

### 4 Diskussion

Der Helikase HELLS werden viele Funktionen zugeschrieben. Zum einen wird diskutiert, HELLS sei wichtig für Zellproliferation und Tumorigenität der Zelle (Geiman, T.M. et al., 2000; Dennis, K. et al., 2001; Raabe, E.H. et al., 2001; Fan, T. et al., 2003). LSH<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen ein geringeres Wachstum, weniger Kapazität zur Koloniebildung und ein damit verbundenes geringeres Transformationspotential (Fan, T. et al., 2003). Dem verminderten Proliferationsverhalten in MEF aus LSH<sup>-/-</sup>-Mäusen liegt laut Sun et al. keine gesteigerte Apoptose, sondern eine erhöhte Expression von antiproliferativen Regulatoren (z.B. p16) und eine verminderte Expression des p16-Inhibitors bmi-1 zugrunde (Sun, L.Q. et al., 2004). Demgegenüber postulieren andere Arbeitsgruppen, HELLS hemme die Apoptose und fördere dadurch die Proliferation (Geiman, T.M. et al., 2000; Lee, D.W. et al., 2000; Geiman, T.M. et al., 2001). Wiederum andere Arbeitsgruppen konstatierten ein gesteigertes Proliferationsverhalten von HELLS-Wildtypzellen unabhängig von apoptotischen Prozessen (Geiman, T.M. et al., 2000; Lee, D.W. et al., 2000; Geiman, T.M. et al., 2001; Raabe, E.H. et al., 2001; Fan, T. et al., 2003; Sun, L.Q. et al., 2004; Fan, T. et al., 2005). Eine Quelle berichtet, dass überexprimiertes HELLS Proliferationsvorgänge hemmt (Raabe, E.H. et al., 2001). In den hier durchgeführten Versuchen wurde keine Veränderung des Apoptoseverhaltens in den Kontrollzellen gegenüber dem der supprimierten HELLS-Zellen beobachtet. Außerdem konnten sowohl Kontrollzellen als auch konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen wie erwartet im Methylzellulose-Assay kontaktunabhängig wachsen. Allerdings wurde mehrfach die Beobachtung gemacht, dass die supprimierten HELLS-Zellen besser wachsen und mehr und engere Kolonien bilden können als die Kontrollzellen. Auch die Arbeitsgruppe Raabe et al. stellte fest, dass überexprimiertes HELLS zu einem verminderten Wachstum führt (Raabe, E.H. et al., 2001). Die Zelle benötigt eine gewisse Menge an HELLS, um die normale Zellproliferation aufrecht zu erhalten. Überexpression oder Suppression des HELLS-Gens führt jedoch zu Proliferationsstörungen. Das Vermögen weiter proliferieren zu können, bleibt dabei erhalten (Raabe, E.H. et al., 2001). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass HELLS nicht essenziell für Proliferationsvorgänge ist. HELLS verleiht

den cALL-Zellen demzufolge weder über ein gesteigertes Proliferationsverhalten noch über eine veränderte Apoptoseaktivität ihre Malignität. Es muss dennoch berücksichtigt werden, dass die zitierten Arbeitsgruppen ihre Versuche *in vivo* durchführten und die Versuche in unserem Fall an Tumorzelllinienzellen durchgeführt wurden (Geiman, T.M. et al., 2000; Geiman, T.M. et al., 2001; Raabe, E.H. et al., 2001; Fan, T. et al., 2003). Die Ergebnisse sind daher nur eingeschränkt miteinander vergleichbar.

In der Literatur gibt es diverse Hinweise dafür, dass HELLS als epigenetischer Regulator wirkt (Yan, Q. et al., 2003; Myant, K. et al., 2008) und Differenzierungsprozesse reprimiert (Xi, S. et al., 2007). Epigenetische Veränderungen wie aberrante DNA-Methylierungen oder Histon-Modifikationen sind gängige Mechanismen in der Tumorentstehung (Egger, G. et al., 2004; Jones, P.A. et al., 2007). Neben globaler CpG-Hypomethylierung, die über die Aktivierung von Transposons und repetitiven Elementen zur chromosomalen Instabilität führt, ist die CpG-Hypermethylierung der Promotoren von Tumorsuppressorgenen und micro-RNAs ein häufig beobachtetes Phänomen in Tumorzellen (Esteller, M., 2008). Dies konnte im Rahmen der Pathogenese des Bronchialkarzinoms (Dammann, R. et al., 2005), Mammakarzinoms, Prostatakarzinoms (Laird, P.W., 2003) und anderen Tumoren, wie dem Retinoblastom oder der von-Hippel-Lindau-Erkrankung (Esteller, M., 2008) bereits gezeigt werden. In Leukämien betrifft die Suppression durch CpG-Hypermethylierung v.a. Gene, die mit Reparatur (Rossi, D. et al., 2004), Detoxifikation (Rossi, D. et al., 2004), Apoptose (Roman-Gomez, J. et al., 2004; Jimenez-Velasco, A. et al., 2005; Campo Dell'Orto, M. et al., 2007), Zellzyklus und Wachstum (Guo, S.X. et al., 2000; Roman-Gomez, J. et al., 2002; Agirre, X. et al., 2003; Roman-Gomez, J. et al., 2004; Roman-Gomez, J. et al., 2004; Agirre, X. et al., 2006; Roman-Gomez, J. et al., 2007) in Verbindung stehen. Histon-Modifikationen, wie Acetylierungen und Methylierungen der Histone 3 und 4 (H3, H4), sind weitere bekannte epigenetische Veränderungen, die Tumore zu ihrem Vorteil nutzen (Sparmann, A. et al., 2006; Moss, T.J. et al., 2007; Esteller, M., 2008; Hublitz, P. et al., 2009). H3-Acetylierung durch Histon-Acetylasen (HAT) führt dabei zur Transkriptionsaktivierung, wohingegen Deacetylierung durch Histon-Deacetylasen (HDAC) die Transkription hemmt (Esteller, M., 2008). Methylierungen können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken, je nachdem

welches Lysin methyliert wird. Hierbei wirkt eine Methylierung des Lysin 4 am Histon 3 (H3K4) aktivierend, wohingegen Methylierungen der Lysine 9 (H3K9) und 27 (H3K27) des Histon 3 zu einer Repression führen.

Die Helikase HELLS ist als Mitglied der SNF2-Familie Teil eines ATP-abhängigen Chromatin-Umbildungs-Komplexes, welcher an der DNA entlang gleiten und die Zugänglichkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren und andere DNA-bindende Faktoren verändern kann (Geiman, T.M. et al., 2000; Lee, D.W. et al., 2000; Yan, Q. et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass HELLS in embryonalen Stammzellen durch direkte Interaktion mit DNA-Methyltransferasen (DNMT) eine Rolle bei der de novo DNA-Methylierung spielt (De La Fuente, R. et al., 2006; Fan, T. et al., 2008; Myant, K. et al., 2008) und über globale Genom-Methylierung an der Bildung des intakten Heterochromatins mitwirkt (Lee, D.W. et al., 2000; Dennis, K. et al., 2001; Myant, K. et al., 2008). DNA-Methylierung wird durch die de novo-Methyltransferasen DNMT3a+b initiiert und durch die Erhaltungs-Methyltransferase DNMT1 aufrecht erhalten (Yan, Q. et al., 2003; Myant, K. et al., 2008). Dieser Vorgang ist physiologisch und findet v.a. im Rahmen des genomischen Imprintings, der X-Chromosom-Inaktivierung, der Regulation Keimzell-spezifischer Gene und der Suppression repetitiver Elemente, Transposons und Retrotransposons statt und trägt so zur chromosomalen Stabilität bei (Dennis, K. et al., 2001; Yan, Q. et al., 2003; Myant, K. et al., 2008). Heterochromatin befindet sich vorwiegend perizentromer und besteht hauptsächlich aus repetitiven Sequenzen. Es ist wichtig für Gen-Repression, normale Zentromerfunktion und nukleäre Organisation (Yan, Q. et al., 2003). Im Gegensatz zu Euchromatin, welches transkriptionell aktiv ist und vorwiegend aus *single copy genes* besteht, besitzt Heterochromatin zur Repression besagter repetitiver Elemente hypermethylierte DNA-Abschnitte, eine geringe H3K4-Methylierung und eine erhöhte H3K9-Methylierung (Yan, Q. et al., 2003; Huang, J. et al., 2004). Repetitive Sequenzen entstammen Transposons und Retrotransposons und umfassen u.a. *long terminal repeats* (LTR), *long interspread nuclear elements* (LINE), *short interspersed nuclear elements* (SINE), *simple repeats*, *minor und major satellit sequences*, *intracisternal A particle* (IAP), *endogenous retrovirus like* (ERVL) und *mammalian apparent LTR-retrotransposons* (MaLR) (Dennis, K. et al., 2001; Huang, J. et al., 2004; De La Fuente,

R. et al., 2006). Eine gestörte Heterochromatinstruktur kann die Chromosomensegregation behindern und mitotische Defekte hervorrufen. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass HELLS im perizentromeren Heterochromatin durch direkte Bindung über DNMT3b mit repetitiven Elementen interagiert (Yan, Q. et al., 2003; Huang, J. et al., 2004; Fan, T. et al., 2008; Myant, K. et al., 2008). Die Histone der betroffenen Region müssen dafür deacetyliert sein (Yan, Q. et al., 2003). In  $LSH^{-/-}$ -Mäusen und murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) konnte neben einer globalen CpG-Hypomethylierung (Jarvis, C.D. et al., 1996; Geiman, T.M. et al., 1998; Dennis, K. et al., 2001; Yan, Q. et al., 2003; Huang, J. et al., 2004) eine Akkumulation von di- und trimethyliertem Lysin 4 am Histon 3 (H3K4) und ein damit überwiegend aktives epigenetisches Muster nachgewiesen werden. Die H3K9-Trimethylierung blieb dagegen von HELLS unbeeinflusst. Auch die H3-Acetylierung und konsekutiv die RNA-Polymerase-II-Aktivität war in diesen Zellen erhöht (Huang, J. et al., 2004). Als Folge dieser epigenetischen Veränderungen zeigten  $LSH^{-/-}$ -Mäuse und MEF Zeichen der genomischen Instabilität mit multipolaren Spindeln, erhöhtem DNA-Gehalt, gestörter Chromosomen-Segregation und gesteigerter Seneszenz (Fan, T. et al., 2003; Huang, J. et al., 2004; Sun, L.Q. et al., 2004). Zudem entwickelten  $LSH^{-/-}$ -Mäuse häufiger Erythroleukämien (Fan, T. et al., 2008). Diese Daten bestätigen, dass HELLS im perizentromeren Heterochromatin als epigenetischer Regulator der CpG-Methylierung und Histon-Modifikationen dient (Yan, Q. et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob HELLS auch in cALL-Zellen als epigenetischer Regulator wirkt, und der Leukämiezelle darüber ihr Malignitätspotential verleiht. In Western-Blot-Experimenten und qRT-PCR-Untersuchungen wurde gezeigt, dass HELLS die H3K9-Trimethylierung durch Erhöhung der Expression der H3K9-Methyltransferase SUV39H1 in den Zelllinien 697 und Nalm6 fördert (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Die durchgeführten Experimente lieferten dagegen keinen Anhalt dafür, dass die H3K4-Trimethylierung durch HELLS beeinflusst wird (siehe 3.5). Die Ergebnisse scheinen zunächst im Widerspruch zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Yan et al. zu stehen, die zeigten, dass MEF  $LSH^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu  $LSH$ -Wildtyp-Mäusen ein erhöhtes H3K4-Methylierungsmuster, jedoch keine Veränderung des H3K9-Methylierungsmusters aufwiesen (Yan, Q. et al., 2003).

Aufgrund des unterschiedlichen zellulären Kontextes und der Tatsache, dass im einen Fall in vivo- und im anderen Fall in vitro-Experimente durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe jedoch nicht mit den hier erhobenen Ergebnissen vergleichbar. Zudem ist unklar, welche weiteren Komponenten epigenetischer Regulationsmechanismen in Tumorzellen zusätzlich dereguliert sind, die dieses veränderte Verhalten unabhängig davon erklären können. Lakshmikuttyamma et al. zeigten, dass in AML-Zelllinien Tumorsuppressorgene wie E-Cadherin und p 15 durch SUV39H1-vermittelte H3K9-Methylierung reprimiert werden (Lakshmikuttyamma, A. et al., 2010). Dies macht deutlich, dass SUV39H1-vermittelte H3K9-Methylierung ein wichtiger Mechanismus in Leukämiezellen ist, um Tumorsuppressorgene zu supprimieren.

In MEF aus LSH<sup>-/-</sup>-Mäusen ist außerdem die H3-Acetylierung erhöht (Huang, J. et al., 2004). Myant et al. zeigten, dass DNMT3b an HELLS gebunden sein muss, damit DNMT1-gebundene HDACs (HDAC 1+2) mit dem Chromatin interagieren und dadurch die Genexpression reprimieren können (Myant, K. et al., 2008). Diesem Modell nach führt eine HELLS-Suppression zu einer verminderten Histon-Deacetylierung und einer erhöhten H3-Acetylierung. Unsere Versuche zeigten dagegen keine gesteigerte H3-Acetylierung in den supprimierten HELLS-Zellen (siehe 3.4). Auch hier ist aufgrund des zellulären Kontextes wieder kein direkter Vergleich dieser beiden Versuchsansätze möglich. Vermutlich kommt das unveränderte Acetylierungsverhalten in Kontrollzellen und supprimierten HELLS-Zellen dadurch zustande, dass es in Tumorzellen neben HELLS noch weitere HDAC-Regulatoren gibt, die bei einem Wegfall von HELLS die Histon-Deacetylierung übernehmen. Aus der Literatur sind diverse weitere HDAC-Regulatoren bekannt (z.B. AP-2alpha als Suppressor von Tumorsuppressorgenen in Kopf-Hals-Tumoren (Bennett, K.L. et al., 2009), FOS-1 als Regulator zellulären Stresses (Hattori, A. et al., 2013), L-Carnitin als Suppressor von Tumorwachstum (Huang, H. et al., 2012)). Zudem ist es möglich, dass HELLS entgegen der Meinung von Myant et al. keinen festen Komplex mit HDAC1+2 eingeht, und eine HELLS-Suppression nicht unbedingt eine komplette Inhibition der HDAC-Aktivität nach sich ziehen muss.



Die Untersuchung der H3K27-Trimethylierung lieferte weitere interessante Ergebnisse. In erster Linie sollte geklärt werden, ob HELLS in cALL-Zellen Einfluss auf den EZH2-vermittelten PRC-Repressionsmechanismus hat, und es eine Verbindung der beiden Repressionsmechanismen in cALL-Zellen gibt. Es gibt unterschiedliche Hypothesen dazu in der Literatur. Kondo et al. beschrieben den PRC-vermittelten Repressionsmechanismus als unabhängig von der DNA-Methylierung (Kondo, Y. et al., 2008). Meine Ergebnisse lieferten jedoch Hinweise darauf, dass der EZH2-vermittelte Repressionsmechanismus der H3K27-Trimethylierung durch HELLS reguliert wird. In konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen wurde ein verminderter H3K27-Trimethylierungsstatus (siehe 3.7) nachgewiesen. Dagegen war dies nicht in transient-supprimierten HELLS-Zellen zu beobachten. Da ein verändertes Methylierungsmuster in der Zelle zu längerfristigen Veränderungen führt, waren diese in den transient-supprimierten HELLS-Zellen zum Zeitpunkt der Messung (nach 48 Stunden) höchstwahrscheinlich noch nicht nachweisbar. Um herauszufinden, ob der verminderten H3K27-Trimethylierung auch eine verminderte EZH2-Expression zugrunde liegt, wurde die EZH2-Expression in qRT-PCR-Experimenten untersucht. Sowohl in transient- als auch in konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen wurde eine signifikant verminderte EZH2-Expression nachgewiesen (siehe 3.7). Die Stärke der Suppression war allerdings in den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen wesentlich geringer ausgeprägt und wurde auf Proteinebene nicht bestätigt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der verwendete Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber EZH2-assoziierten Proteinen besitzt (Datasheet). Es ist außerdem bekannt, dass EZH1 in EZH2<sup>-/-</sup>-ES-Zellen die H3K27-Trimethylierung aufrechterhält (Shen, X. et al., 2008). Margueron et al. zeigten, dass EZH1 allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als EZH2 an der H3K27-Trimethylierung beteiligt ist (Margueron, R. et al., 2008). Seit nicht allzu langer Zeit ist zudem bekannt, dass die Methylasefunktion von EZH2 nicht wie bisher vermutet nur von der Isoform  $\alpha$  übernommen wird, sondern dass noch eine Isoform  $\beta$  existiert, die genau wie die Isoform  $\alpha$  eine Kernlokalisierungsfunktion und eine Histon-Methylase-Funktion besitzt (Grzenda, A. et al., 2013). Sie kann ebenso wie die Isoform  $\alpha$  mit den EZH2-assoziierten Proteinen SUZ12 und EED in einen Komplex treten und übernimmt ähnliche Funktionen in der Gensuppression (Grzenda, A. et al., 2013). Eine

experimentelle EZH2-Suppression zieht somit höchstwahrscheinlich keinen dauerhaften bzw. kompletten Funktionsverlust der H3K27-Trimethylierung nach sich. Gestützt wird die Hypothese, dass HELLS Einfluss auf die EZH2-vermittelte H3K27-Trimethylierung besitzt, durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Laut Xi et al. (Xi, S. et al., 2007) spielt HELLS eine Rolle bei der Vermittlung der Polycomb-Repressions-Komplex (PRC) vermittelten Gen-Repression. Dabei bindet HELLS in embryonalen Geweben und MEF direkt an die Promotor-Regionen von HoxA 6+7 und über DNMT3b an die PRC1-Komponente bmi 1 und beeinflusst so PRC-vermittelte Histonmodifikationen während der Embryonalentwicklung. Es scheint damit in einen Feedback-Mechanismus involviert zu sein, der die DNA-Methylierung und Abschaltung von PRC-Zielgenen verstärkt (Xi, S. et al., 2007). LSH<sup>-/-</sup>-MEF zeigen an HoxA 6+7-Promotoren neben CpG-Hypomethylierung und erhöhter H3-Acetylierung eine erniedrigte DNMT3b-Bindung, erniedrigte EZH2-Konzentrationen und erniedrigte H3K27-Trimethylierungen (Xi, S. et al., 2007). Auch Tao et al. sehen einen Zusammenhang zwischen HELLS und der Repression von Hox-Genen. Ihre Versuche zeigten, dass HELLS die DNA-Methylierung und Pol-II-Ablösung am HoxC-8-Promotor fördert (Tao, Y. et al., 2010). Ausgedehnte Pol-II-Ablösung wurde in Drosophila als zusammengehörig mit der PRC-vermittelten Repression entdeckt (Chopra, V.S. et al., 2009). Diese Ergebnisse und meine Ergebnisse verdeutlichen, dass ein funktioneller Link zwischen PRC-Komplex- und HELLS-vermittelten Repressionsmechanismen besteht. Welcher genau, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Um herauszufinden, ob HELLS an der Repression von Differenzierungsgenen beteiligt ist, wurde eine Microarray-Analyse transient-supprimierter HELLS-Zellen und Kontrollzellen durchgeführt. Diese führte zu dem Ergebnis, dass tatsächlich einige Gene, die im Zusammenhang mit der Regulierung von Differenzierungsprozessen stehen, in den untersuchten Proben differenziell exprimiert waren (siehe 3.8). Hierbei handelte sich v.a. um die Gene RNF2 und ATRX, welche in den Kontrollzellen im Vergleich zu den transient-supprimierten HELLS-Zellen mindestens zweifach überexprimiert waren. RNF2 ist Teil des PRC1L-Komplexes, der in die Repression von Differenzierungsgenen durch den PRC-Komplex involviert ist und zusammen mit EZH2 genomisch geprägte Gene (*imprinted genes*) während der Embryogenese

reprimiert (Terranova, R. et al., 2008). ATRX besitzt als Mitglied der SNF2-Familie eine Helikasedomäne und Attribute eines Transkriptionsfaktors und ist wie HELLS an der Genregulation des perizentromeren Heterochromatins durch Chromatin-Umbildung beteiligt. Eine Interaktion mit EZH2 wird in der Literatur beschrieben (Cardoso, C. et al., 1998).

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass HELLS über die Förderung der H3K9-Trimethylierung und indirekt über die Förderung der H3K27-Trimethylierung höchstwahrscheinlich Inhibitoren differenzierungshemmender Gene wie ATRX und RNF2 hemmt. Über diesen Mechanismus supprimiert HELLS Differenzierungsprozesse in den cALL-Zellen und verleiht ihnen so ihre Malignität. Welche Inhibitoren dies sein könnten, soll Gegenstand weiterer Forschung sein.

### 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, welche Rolle die Helikase HELLS in der Pathogenese der pädiatrischen cALL spielt. HELLS wurde in zwei pädiatrischen Leukämie-Zelllinien mittels RNA-Interferenz sowohl transient als auch konstitutiv supprimiert und auf verschiedene zelluläre Funktionen hin getestet. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass sich die Zelllinienzellen überwiegend im pro-B-Zellstadium befinden, und dass HELLS keinen Einfluss auf apoptotische Vorgänge besitzt. In Methylzellulose-Assays zeigte sich, dass die supprimierten HELLS-Zellen zwar mehr und engere Kolonien bildeten, aber sowohl supprimierte HELLS-Zellen als auch Kontrollzellen proliferieren konnten. Dies lässt darauf rückschließen, dass eine Überexpression von HELLS Proliferationsprozesse hemmt, HELLS aber nicht primär wichtig ist für Proliferationsvorgänge. Durch Western-Blot-Untersuchungen, qRT-PCR-Experimente und Immunfluoreszenzfärbungen wurde herausgefunden, dass HELLS in den cALL-Zellen als epigenetischer Regulator dient. Es zeigten sich in den konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen sowohl eine verminderte H3K9-Trimethylierung, bedingt durch eine verminderte Expression der H3K9-Methyltransferase SUV39H1, als auch eine verminderte H3K27-Trimethylierung, bedingt durch eine verminderte EZH2-Expression. Dies lässt vermuten, dass EZH2 und HELLS in cALL-Zellen interagieren. Der genaue Interaktionsmechanismus ist jedoch weiterhin unklar. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expression differenzierungshemmender Gene wie ATRX und RNF2 in den Kontrollzellen signifikant erhöht ist. Dies lässt schlussfolgern, dass HELLS über eine gesteigerte H3K9- und H3K27-Trimethylierung höchstwahrscheinlich Inhibitoren differenzierungshemmender Gene wie ATRX und RNF2 hemmt und über diesen Mechanismus Differenzierungsprozesse in cALL-Zellen supprimiert. Dieser Mechanismus könnte HELLS dazu befähigen, zur Pathogenese der cALL beizutragen. In vivo-Versuche und weitere in vitro-Versuche werden benötigt, um diese Hypothese zu festigen und um herauszufinden, welche Inhibitoren dies sein könnten. Ob HELLS dazu geeignet ist, in Zukunft als prognostischer Marker in der pädiatrischen cALL zu dienen, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

„Hoffnung ist eben nicht Optimismus;  
es ist nicht die Überzeugung, dass etwas gut ausgeht,  
sondern die Gewissheit, dass etwas Sinn hat, ohne Rücksicht darauf, wie es ausgeht.“

- Václav Havel -

## 6 Literaturverzeichnis

Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y. and Jacobsen, S.E. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15 (2001) 659-669.

Agirre, X., Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Garate, L., Montiel-Duarte, C., Navarro, G., Vazquez, I., Zalacain, M., Calasanz, M.J., Heiniger, A., Torres, A., Minna, J.D. and Prosper, F. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 25 (2006) 1862-1870.

Agirre, X., Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J.I., Cordeu, L., Garate, L., San Jose-Eneriz, E., Abizanda, G., Rodriguez-Otero, P., Fortes, P., Rifon, J., Bandres, E., Calasanz, M.J., Martin, V., Heiniger, A., Torres, A., Siebert, R., Roman-Gomez, J. and Prosper, F. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 69 (2009) 4443-4453.

Agirre, X., Vizmanos, J.L., Calasanz, M.J., Garcia-Delgado, M., Larrayoz, M.J. and Novo, F.J. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene* 22 (2003) 1070-1072.

Ballestar, E., Paz, M.F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M.F., Espada, J., Cigudosa, J.C., Huang, T.H. and Esteller, M. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J* 22 (2003) 6335-6345.

Beinvogl, B. Hochaufgereinigte CD19+CD10+ fetale B-Zellen aus Nabelschnurblut als Vergleichszellen zur pädiatrischen Akuten Lymphoblastischen Leukämie (cALL) identifizieren eine neue Expressionssignatur des malignen Phänotyps. Labor für Funktionelle Genomik und Transplantationsbiologie. München, Technische Universität München (2009).

Bennett, K.L., Romigh, T. and Eng, C. AP-2alpha induces epigenetic silencing of tumor suppressive genes and microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 4 (2009) e6931.

Bernstein, B.E., Meissner, A. and Lander, E.S. The mammalian epigenome. *Cell* 128 (2007) 669-681.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A. and Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441 (2006) 349-353.

Buske, C. and Humphries, R.K. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 71 (2000) 301-308.

Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22 (2004) 55-79.

Campo Dell'Orto, M., Banelli, B., Giarin, E., Accordi, B., Trentin, L., Romani, M., te Kronnie, G. and Basso, G. Down-regulation of DLX3 expression in MLL-AF4 childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation. *Oncol Rep* 18 (2007) 417-423.

Cardoso, C., Timsit, S., Villard, L., Khrestchatisky, M., Fontes, M. and Colleaux, L. Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 679-684.

Chopra, V.S., Hong, J.W. and Levine, M. Regulation of Hox gene activity by transcriptional elongation in *Drosophila*. *Curr Biol* 19 (2009) 688-693.

Christensen, J.L. and Weissman, I.L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 14541-14546.

Dammann, R., Strunnikova, M., Schagdarsurengin, U., Rastetter, M., Papritz, M., Hattenhorst, U.E., Hofmann, H.S., Silber, R.E., Burdach, S. and Hansen, G. CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* 41 (2005) 1223-1236.

Datasheet "EZH2-Antikörper." <http://www.cellsignal.com/products/4905.html>. Stand: 15.07.2013

Datasheet "*Gene Chip Human Gene 1.0 ST Arrays*." [http://www.affymetrix.com/estore/browse/products.jsp?productId=131453#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/browse/products.jsp?productId=131453#1_1). Stand: 23.01.2013

De La Fuente, R., Baumann, C., Fan, T., Schmidtman, A., Dobrinski, I. and Muegge, K. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. *Nat Cell Biol* 8 (2006) 1448-1454.

Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q. and Muegge, K. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15 (2001) 2940-2944.

Efron, B. and Tibshirani, R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 23 (2002) 70-86.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429 (2004) 457-463.

- Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358 (2008) 1148-1159.
- Fan, T., Hagan, J.P., Kozlov, S.V., Stewart, C.L. and Muegge, K. Lsh controls silencing of the imprinted *Cdkn1c* gene. *Development* 132 (2005) 635-644.
- Fan, T., Schmidtman, A., Xi, S., Briones, V., Zhu, H., Suh, H.C., Gooya, J., Keller, J.R., Xu, H., Roayaei, J., Anver, M., Ruscetti, S. and Muegge, K. DNA hypomethylation caused by Lsh deletion promotes erythroleukemia development. *Epigenetics* 3 (2008) 134-142.
- Fan, T., Yan, Q., Huang, J., Austin, S., Cho, E., Ferris, D. and Muegge, K. Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis. *Cancer Res* 63 (2003) 4677-4683.
- Ferrando, A.A. and Look, A.T. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 40 (2003) 274-280.
- Freeman, W.M., Robertson, D.J. and Vrana, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29 (2000) 1042-1046, 1048-1055.
- Geiman, T.M., Durum, S.K. and Muegge, K. Characterization of gene expression, genomic structure, and chromosomal localization of Hells (Lsh). *Genomics* 54 (1998) 477-483.
- Geiman, T.M. and Muegge, K. Lsh, an SNF2/helicase family member, is required for proliferation of mature T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 4772-4777.
- Geiman, T.M., Tessarollo, L., Anver, M.R., Kopp, J.B., Ward, J.M. and Muegge, K. Lsh, a SNF2 family member, is required for normal murine development. *Biochim Biophys Acta* 1526 (2001) 211-220.
- Grzenda, A., Lomberk, G., Svingen, P., Mathison, A., Calvo, E., Iovanna, J., Xiong, Y., Faubion, W. and Urrutia, R. Functional characterization of EZH2beta reveals the increased complexity of EZH2 isoforms involved in the regulation of mammalian gene expression. *Epigenetics Chromatin* 6 (2013) 3.
- Guo, S.X., Taki, T., Ohnishi, H., Piao, H.Y., Tabuchi, K., Bessho, F., Hanada, R., Yanagisawa, M. and Hayashi, Y. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk Res* 24 (2000) 39-46.
- Hattori, A., Mizuno, T., Akamatsu, M., Hisamoto, N. and Matsumoto, K. The *Caenorhabditis elegans* JNK signaling pathway activates expression of stress response genes by derepressing the Fos/HDAC repressor complex. *PLoS Genet* 9 (2013) e1003315.
- Herman, J.G. and Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349 (2003) 2042-2054.



Holliday, R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238 (1987) 163-170.

Huang, H., Liu, N., Guo, H., Liao, S., Li, X., Yang, C., Liu, S., Song, W., Liu, C., Guan, L., Li, B., Xu, L., Zhang, C., Wang, X., Dou, Q.P. and Liu, J. L-carnitine is an endogenous HDAC inhibitor selectively inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro. *PLoS One* 7 (2012) e49062.

Huang, J., Fan, T., Yan, Q., Zhu, H., Fox, S., Issaq, H.J., Best, L., Gangi, L., Munroe, D. and Muegge, K. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 5019-5028.

Hublitz, P., Albert, M. and Peters, A.H. Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *Int J Dev Biol* 53 (2009) 335-354.

Janeway, C. The Humoral Immune Response. In: "Janeway's Immunobiology", Masson, S., Lawrence, E., Lucas, G., Goatly, B. (Hrsg.), Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC, an informa business, New York, 2008, 7. Auflage, 382-383

Jarvis, C.D., Geiman, T., Vila-Storm, M.P., Osipovich, O., Akella, U., Candeias, S., Nathan, I., Durum, S.K. and Muegge, K. A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes. *Gene* 169 (1996) 203-207.

Jimenez-Velasco, A., Roman-Gomez, J., Agirre, X., Barrios, M., Navarro, G., Vazquez, I., Prosper, F., Torres, A. and Heiniger, A. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19 (2005) 2347-2350.

Jones, P.A. and Baylin, S.B. The epigenomics of cancer. *Cell* 128 (2007) 683-692.

Jorgensen, H.F., Giadrossi, S., Casanova, M., Endoh, M., Koseki, H., Brockdorff, N. and Fisher, A.G. Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells. *Cell Cycle* 5 (2006) 1411-1414.

Kondo, Y., Shen, L., Cheng, A.S., Ahmed, S., Bumber, Y., Charo, C., Yamochi, T., Urano, T., Furukawa, K., Kwabi-Addo, B., Gold, D.L., Sekido, Y., Huang, T.H. and Issa, J.P. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 40 (2008) 741-750.

Krivtsov, A.V. and Armstrong, S.A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7 (2007) 823-833.

Laird, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 253-266.

Lakshmikuttyamma, A., Scott, S.A., DeCoteau, J.F. and Geyer, C.R. Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene* 29 (2010) 576-588.

Lee, D.W., Zhang, K., Ning, Z.Q., Raabe, E.H., Tintner, S., Wieland, R., Wilkins, B.J., Kim, J.M., Blough, R.I. and Arceci, R.J. Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia. *Cancer Res* 60 (2000) 3612-3622.

Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P.P., Caldas, C., Miska, E. and Esteller, M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67 (2007) 1424-1429.

Mack, G.S. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst* 98 (2006) 1443-1444.

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D. and Reinberg, D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 32 (2008) 503-518.

Moss, T.J. and Wallrath, L.L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 618 (2007) 163-174.

Myant, K. and Stancheva, I. LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription. *Mol Cell Biol* 28 (2008) 215-226.

Naumann, L. Untersuchungen zum differenzierten Wirkungsprofil von Glucocorticoiden in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin (2005).

Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. and Georgopoulos, K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* 190 (1999) 1201-1214.

Pui, C.H., Relling, M.V. and Downing, J.R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350 (2004) 1535-1548.

Raabe, E.H., Abdurrahman, L., Behbehani, G. and Arceci, R.J. An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev Dyn* 221 (2001) 92-105.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406 (2000) 593-599.

Richter, G.H., Plehm, S., Fasan, A., Rossler, S., Unland, R., Bennani-Baiti, I.M., Hotfilder, M., Lowel, D., von Luetlichau, I., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Kovar, H., Staeger, M.S., Muller-Tidow, C. and Burdach, S. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth

and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 5324-5329.

Roman-Gomez, J., Castillejo, J.A., Jimenez, A., Gonzalez, M.G., Moreno, F., Rodriguez Mdel, C., Barrios, M., Maldonado, J. and Torres, A. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99 (2002) 2291-2296.

Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Agirre, X., Castillejo, J.A., Barrios, M., Andreu, E.J., Prosper, F., Heiniger, A. and Torres, A. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18 (2004) 362-365.

Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Agirre, X., Castillejo, J.A., Navarro, G., Barrios, M., Andreu, E.J., Prosper, F., Heiniger, A. and Torres, A. Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 91 (2004) 707-713.

Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Castillejo, J.A., Agirre, X., Barrios, M., Navarro, G., Molina, F.J., Calasanz, M.J., Prosper, F., Heiniger, A. and Torres, A. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 104 (2004) 2492-2498.

Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Cordeu, L., Vilas-Zornoza, A., San Jose-Eneriz, E., Garate, L., Castillejo, J.A., Martin, V., Prosper, F., Heiniger, A., Torres, A. and Agirre, X. WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 43 (2007) 2736-2746.

Roman-Trufero, M., Mendez-Gomez, H.R., Perez, C., Hijikata, A., Fujimura, Y., Endo, T., Koseki, H., Vicario-Abejon, C. and Vidal, M. Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B. *Stem Cells* 27 (2009) 1559-1570.

Rossi, D., Capello, D., Gloghini, A., Franceschetti, S., Paulli, M., Bhatia, K., Saglio, G., Vitolo, U., Pileri, S.A., Esteller, M., Carbone, A. and Gaidano, G. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* 89 (2004) 154-164.

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.C. and Orkin, S.H. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32 (2008) 491-502.

Sitzmann, F.C. Hämatologische und onkologische Erkrankungen im Kindesalter: Akute lymphoblastische Leukämie (ALL). In: "Pädiatrie", Bob, A., Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, 3. Auflage, 492-493

Sparmann, A. and van Lohuizen, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 846-856.

Sun, L.Q., Lee, D.W., Zhang, Q., Xiao, W., Raabe, E.H., Meeker, A., Miao, D., Huso, D.L. and Arceci, R.J. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18 (2004) 1035-1046.

Tao, Y., Xi, S., Briones, V. and Muegge, K. Lsh mediated RNA polymerase II stalling at HoxC6 and HoxC8 involves DNA methylation. *PLoS One* 5 (2010) e9163.

Terranova, R., Yokobayashi, S., Stadler, M.B., Otte, A.P., van Lohuizen, M., Orkin, S.H. and Peters, A.H. Polycomb group proteins Ezh2 and Rnf2 direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos. *Dev Cell* 15 (2008) 668-679.

Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 5116-5121.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39 (2007) 457-466.

Xi, S., Zhu, H., Xu, H., Schmidtman, A., Geiman, T.M. and Muegge, K. Lsh controls Hox gene silencing during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 14366-14371.

Yan, Q., Cho, E., Lockett, S. and Muegge, K. Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 8416-8428.

Yan, Q., Huang, J., Fan, T., Zhu, H. and Muegge, K. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J* 22 (2003) 5154-5162.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transformation der hämatopoetischen Zellen in der Pathogenese der ALL (Pui, C.H. et al., 2004).....	- 5 -
Abbildung 2: HELLS-Expression in verschiedenen Geweben .....	- 11 -
Abbildung 3: Intron-/ Exon-Grenzen des PASG-Gens (Lee et al., 2000).....	- 12 -
Abbildung 4: Durchflusszytometrie von untransfizierten 697-Zellen A Dot-Plots B Histogramme .....	- 42 -
Abbildung 5: Transiente HELLS-Suppression für Apoptose-Assay und Western-Blot-Untersuchungen in 697- und Nalm6-Zellen .....	- 43 -
Abbildung 6: Annexin V-PE Apoptose-Detektions-Assay von 697-Zellen A Kontrollzellen, Gate 1: früh-apoptotische Zellen, Gate 2: spät-apoptotische Zellen B Transient-supprimierte HELLS-Zellen, Gate 1: früh-apoptotische Zellen, Gate 2: spät-apoptotische Zellen.....	- 44 -
Abbildung 7: Konstitutive HELLS-Suppression für Methylzellulose-Assay und Western-Blot-Untersuchungen in Nalm6-Zellen.....	- 45 -
Abbildung 8: Methylzellulose-Assay mit konstitutiv-supprimierten Nalm6-Zellen und Kontrollzellen A Links: GFP-Kontrollzellen, rechts: konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen B Oben: GFP-Kontrollzellen, unten: konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen.....	- 46 -
Abbildung 9: HELLS fungiert als Rekrutierungsfaktor für DNMTs und HDACs, um repressives Chromatin herzustellen (Myant et al, 2007) .....	- 47 -
Abbildung 10: HELLS-Suppression für Western-Blot-Untersuchungen in transient-supprimierten 697- und Nalm6-Zellen A qRT-PCR B Western-Blot, <i>net intensity</i> 0,23 (697) .....	- 48 -
Abbildung 11: Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen A Untransfizierte Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-	

Zellen (*net intensity* 0,78 bzw. 0,77) B GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen ..... - 48 -

Abbildung 12: Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen A Untransfizierte 697-Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697) B GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, *net intensity* 0,95) ..... - 49 -

Abbildung 13: Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen A Untransfizierte 697-Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Negativkontrollen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697) B GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6, *net intensity* 0,30) ..... - 50 -

Abbildung 14: Expression von SUV39H1 in 697- und Nalm6-Zellen ..... - 51 -

Abbildung 15: Immunfluoreszenz-Färbung von GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierten Nalm6-Zellen auf H3K9-Trimethylierung (FITC, grün), DAPI-Kernfärbung (blau) A GFP-Kontrollzellen B Konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen ..... - 52 -

Abbildung 16: Western-Blot von 697- und Nalm6-Zellen A Untransfizierte Zellen behandelt mit DMSO oder TSA, Kontrollzellen und transient-supprimierte HELLS-Zellen (697, *net intensity* 0,85) B GFP-Kontrollzellen und konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6)..... - 54 -

Abbildung 17: EZH2-Suppression (Nalm6)..... - 54 -

Abbildung 18: Western-Blot von Nalm6-Zellen; Kontrollzellen, transient-supprimierte HELLS-Zellen und transient-supprimierte EZH2-Zellen (EZHZ2\_2: *net intensity* 0,37)... ..... - 55 -

Abbildung 19: EZH2-Expression in verschiedenen Geweben ..... - 56 -

Abbildung 20: Expression von EZH2 in 697- und Nalm6-Zellen oben: transient-supprimierte HELLS-Zellen (697), unten: konstitutiv-supprimierte HELLS-Zellen (Nalm6)..... - 56 -

Abbildung 21: Western-Blot von transient-supprimierten HELLS-Zellen (697) und konstitutiv-supprimierten HELLS-Zellen (Nalm6), *net intensity* 0,93 (697) bzw. 0,72 (Nalm6)..... - 57 -

Abbildung 22: Western-Blot transient-supprimierter HELLS- und EZH2-Zellen (Nalm6), *net intensity* HELLS7: 0,35, EZH2\_2: 0,34..... - 57 -

Abbildung 23: Transiente HELLS-Suppression für Microarray-Untersuchungen in 697- und Nalm6-Zellen..... - 59 -

Abbildung 24: Differenzielle Expression in transient-supprimierten 697- und Nalm6-Zellen A *Heat-Map* Spalte 1: Nalm6-Kontrollzellen, Spalte 2: 697-Kontrollzellen, Spalte 3: Nalm6-siHELLS5, Spalte 4: Nalm6-siHELLS7, Spalte 5: 697-siHELLS7, grün = verminderte Expression, rot = erhöhte Expression B qRT-PCR zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse, Expression von RNF2 und ATRX in 697-Zellen ..... - 59 -

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung wichtiger Oberflächenexpressionsmarker im Laufe der B-Zell-Reifung .....	- 2 -
Tabelle 2: Epigenetische Veränderungen bei Transkriptionsaktivierung und Transkriptionsrepression .....	- 8 -
Tabelle 3: Differenzielle Expression in cALL-Zellen (sortiert nach abfallender Signifikanz) .....	- 10 -
Tabelle 4: Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	- 16 -
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien .....	- 17 -
Tabelle 6: siRNAs .....	- 18 -
Tabelle 7: Vektoren .....	- 18 -
Tabelle 8: Primärantikörper.....	- 19 -
Tabelle 9: Sekundärantikörper.....	- 19 -
Tabelle 10: Fluoreszenz-markierte Antikörper.....	- 20 -
Tabelle 11: Primer-Assays .....	- 20 -
Tabelle 12: Arrays .....	- 20 -
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien.....	- 21 -
Tabelle 14: Geräte .....	- 22 -
Tabelle 15: Pipettierschema Master-Mix .....	- 26 -
Tabelle 16: Zyklen reverse Transkription .....	- 26 -
Tabelle 17: Pipettierschema qRT-PCR.....	- 28 -
Tabelle 18: Reagenzien für den Ligationsschritt bei der Herstellung des pSIREN-Vektors .....	- 30 -
Tabelle 19: Fluorochrome mit Emissionsspektrum.....	- 33 -
Tabelle 20: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen .....	- 34 -



Tabelle 21: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgelpuffer .....	- 34 -
Tabelle 22: Zusammensetzung der Laufpuffer.....	- 35 -
Tabelle 23: Stromstärke in Ampère.....	- 35 -
Tabelle 24: Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Primärantikörper.....	- 36 -
Tabelle 25: Zusammensetzung der Waschpuffer .....	- 36 -
Tabelle 26: Probenansätze für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen.....	- 37 -
Tabelle 27: Proben für die Microarray-Analyse.....	- 39 -
Tabelle 28: Expressionsstärke der Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie von untransfizierten 697-Zellen (dargestellt als Zunahme der <i>relative brightness</i> im Vergleich zur Isotypkontrolle) .....	- 42 -
Tabelle 29: Anteil der apoptotischen Zellen in Kontrollzellen und supprimierten HELLS-Zellen .....	- 44 -

## **Danksagung**

Herzlichen Dank an meinen Betreuer Herrn PD. Dr. G. Richter für die hilfreichen und motivierenden Gespräche, die mir immer sehr wichtig waren.

Mein Dank geht zudem an das gesamte Team der Arbeitsgruppe Richter. An Colette Zobywalski, mit der ich die meiste Zeit im Labor verbracht habe, und die mir geduldig alle Fähigkeiten, die ich für die Durchführung dieser Dissertation brauchte, beigebracht hat. An Uwe Thiel, der mich gewissenhaft in die Durchflusszytometrie eingeführt hat. An unsere Biologinnen Kristina Hauer, Stephanie Plehm und Annette Fasan, die ich immer alles fragen konnte und die mir stets mit ihrem Rat zur Seite standen. Danke euch!

Danke auch an meinen Doktorvater Herrn Prof. St. Burdach, der mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern und Christoph, die mich immer motiviert haben und mich beim Korrektur Lesen und Formatieren unterstützt haben.