

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg  
Prof. Dr. Martin Horstmann

## **Untersuchungen zur funktionellen Rolle des Zink-Finger- Transkriptionsfaktors ZNF423 in der Entstehung akuter lymphatischer Leukämien des Kindesalters**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:  
Bine Frauke Klingler  
aus Carlton/Victoria, Australien

Hamburg 2016

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.01.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:                    Prof. Dr. Martin Horstmann**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:                    Prof. Dr. Walter Fiedler**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
3.1	Akute Lymphatische Leukämie .....	4
3.1.1	Definition .....	4
3.1.2	Klassifikation .....	5
3.1.3	Pathogenese .....	5
3.1.3.1	Chromosomenaberrationen .....	5
3.1.3.2	Mutationen in Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen ....	6
3.1.3.3	Epigenetische Veränderungen .....	7
3.2	Hämatopoese .....	8
3.2.1	B-Zell-Differenzierung .....	8
3.3	ZNF423 .....	9
3.3.1	Interaktion ZNF423 - EBF .....	11
3.3.2	ZNF423 als Cofaktor in der Signaltransduktion der BMPs .....	12
3.3.3	Bedeutung ZNF423 in ALL .....	13
3.4	Transcription Activator-Like Effector Nucleases .....	13
3.4.1	Möglichkeiten des Gen-Knock-downs und der Gen-Modifikation .....	13
3.4.2	Funktion von TALENs .....	14
3.4.3	Aufbau von TALENs .....	14
3.4.3.1	Der Transcription Activator-Like Effector in TALENs .....	14
3.4.3.2	Die Nuklease in TALENs .....	15
3.4.3.3	Funktionsweise der TALENs .....	15
3.4.4	Nichthomologes ‚ <i>Endjoining</i> ‘ .....	16
3.4.5	Homologe Rekombination .....	16
3.4.6	TALEN Gen-Knock-out .....	17
3.4.7	TALEN Gen-Modifizierung .....	17
3.4.8	CEL-1 Assay zum Nachweis des Gen-Knock-outs auf genomischer Ebene .....	17
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
4.1	Chemikalien .....	19

4.2	Kits .....	19
4.3	Biologisches Material .....	19
4.3.1	Bakterien.....	19
4.3.2	Zelllinien.....	20
4.3.3	Primäres Material.....	20
4.4	Medien und Reagenzien für die Zellkultur .....	21
4.5	Molekularbiologie .....	21
4.5.1	Expressionsplasmide .....	21
4.5.2	Plasmide für Reporteranalysen .....	22
4.5.3	Weitere verwendete Plasmide .....	22
4.5.4	Medium für die Bakterienkultur .....	23
4.5.5	Transformation von Bakterien .....	23
4.5.6	Mutagenese .....	23
4.5.7	Plasmidisolierung.....	24
4.5.8	PCR .....	24
4.5.9	PCR-Purification.....	25
4.5.10	Sequenzieren .....	25
4.5.11	Methylierung .....	26
4.5.12	Restriktionsverdau .....	26
4.5.13	Gelextraktion.....	27
4.5.14	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung .....	27
4.5.15	RNA-Isolation.....	27
4.5.16	cDNA-Synthese.....	27
4.5.17	TA-Klonierung .....	28
4.5.18	Ligationen .....	28
4.5.19	CEL-1 Assay .....	28
4.5.20	qPCR .....	29
4.5.21	Erstellung des Vektors pCR2.1_Matrix .....	29
4.5.22	Erstellung der Vektoren pcDNA3.1(+)_YFP_stop und pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex.....	30
4.6	Zellkultur.....	31
4.6.1	Kultivierung von Zellen.....	31
4.6.2	Medien für die Zellkultur.....	31
4.6.3	Transfektion .....	32
4.6.4	Amaxa-Transfektion .....	32

4.6.5	MethoCult Medium .....	32
4.6.6	Reportergenstudien.....	32
4.6.7	FACS-Messung.....	33
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
5.1	Methylierungsstudien der ZNF423-CpG-Insel .....	34
5.1.1	Methylierungsstudien der CpG-Insel und des ZNF423 $\alpha$ -Promotors .....	34
5.1.2	Methylierungsstudien der CpG-Insel-Mutanten.....	36
5.2	TALEN.....	41
5.2.1	Bestimmung der Schnittstelle der TALENs .....	41
5.2.2	Überprüfung von ZNF423-Exon 4 auf Einzelnukleotid- Polymorphismen .....	41
5.2.3	Amaya-Transfektionsratenmessung.....	42
5.2.4	Klonierung der „Matrix“ (Reparaturvorlage Homologe Rekombination).....	44
5.2.5	Klonierung der Kontrollvektoren pcDNA3.1(+)_YFP_stop und pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex.....	45
5.2.6	FACS-Analyse des Vektors pcDNA3.1(+)_YFP_stop zur Überprüfung der Fluoreszenz des integrierten YFPs .....	46
5.2.7	Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)_YFP_stop exprimierten ZNF423-Proteins...	47
5.2.8	Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex exprimierten ZNF423-Proteins.....	48
5.2.9	Testung des Knock-outs in 293T-Zellen.....	49
5.2.10	Testung des Knock-outs in 697-Zellen.....	50
5.2.11	CEL-1 Assay .....	51
5.2.12	Testung der ZNF423-Modifikation (YFP_stop Integration) in 293T-Zellen.....	55
5.2.13	Transfektion des Matrix-Vektors in 293T-Zellen.....	58
5.2.14	Transfektion des Matrix-Vektors in U2OS-Zellen .....	59
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
6.1	Methylierungsstudien der ZNF423-CpG-Insel .....	61
6.1.1	Methylierungsstudien CpG-Insel mit ZNF423 $\alpha$ -Promotor.....	61
6.1.2	Methylierungsstudien der CpG-Insel Mutanten .....	62

6.1.3	Zusammenfassung Methylierungsstudien.....	63
6.2	TALEN.....	64
6.2.1	Knock-out von ZNF423 .....	64
6.2.1.1	ZNF423-Knock-out in 293T- und 697-Zellen .....	64
6.2.1.2	CEL-1 Assay .....	66
6.2.2	Modifikation von ZNF423 durch Integration von YFP_stop .....	67
6.2.2.1	Matrix und Kontrollvektoren pcDNA3.1(+)_YFP_stop und pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex.....	67
6.2.2.2	Modifikation von ZNF423 in 293T-Zellen.....	69
6.2.3	Zusammenfassung TALEN .....	71
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>87</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>88</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BRE	<i>BMP2 responsive element</i>
C	Cytosin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cel	<i>Celery</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CpG Dinukleotid	Cytosin-Guanin Dinukelotid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EBF	<i>Early B-cell factor</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
hFlt3-L	Humaner Flt-3 Ligand
hIL6	Humanes Interleukin 6
HOX11	<i>Homeobox gene 11</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i> (Homologe Rekombination)
HS	<i>Hematopoietic stem cells</i> (Hämatopoetische Stammzellen)
hSCF	Humaner Stammzellfaktor
hTPO	Humanes Thrombopoetin

Ig	Immunglobulin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
LB	Luria Bertani
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NHEJ	<i>Non-homologous endjoining</i> ( <i>Nichthomologes Endjoining</i> )
NID	<i>Nurd interacting domain</i>
O/E	Olf-EBF1
Olf-1	<i>Olfactory factor 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ( <i>Polymerase-Kettenreaktion</i> )
RB1	Retinoblastom-Gen 1
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>Replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RVD	<i>Repeat-variable Di-residue</i>
SAM	S-Adenosinmethionin
SH2	<i>Scr-2 homology</i>
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleotide acid</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleotide acid</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ( <i>Einzelnukleotidpolymorphismus</i> )
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
T	Thymin
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
ZNF423	Zinkfingerprotein 423

## 2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Wesentliches Merkmal der akuten lymphatischen Leukämie ist die Differenzierungsblockade von lymphopoetischen Vorläuferzellen.

Harder et al. identifizierten eine aberrante Expression des Transkriptionsmodulators ZNF423 in einer Vielzahl von ALL-Patienten. ZNF423 agiert als Cofaktor für die Transkriptionsfaktoren SMAD1 und SMAD4 in BMP2/4-abhängigen Reaktionswegen. Es wurde der Nachweis erbracht, dass eine BMP2-Stimulation vor dem Hintergrund der aberranten Demethylierung regulatorischer DNA-Sequenzen zu einer transkriptionellen Induktion von ZNF423 in ALL führt. Des Weiteren stellt ZNF423 einen Antagonisten des Transkriptionsfaktors EBF1 dar, welcher die Expression von Komponenten des Prä-B-Zellrezeptors reguliert und die B-Zelldifferenzierung determiniert. Die Inhibition von EBF1 durch ZNF423 führte in einem Xenotransplantationsmodell zu einem B-Zellmaturationsarrest.

Die aberrante Hypomethylierung des ZNF423-Locus ist eine der Ursachen für die Expression von ZNF423 in leukämischen Zellen. Harder et al. identifizierten spezifische Positionen in der 5'-CpG-Insel des ZNF423-Promotors, die im Knochenmark von ALL-Patienten aberrante Methylierungsmuster im Vergleich zu gesunden Knochenmarkszellen aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen überprüft werden, welchen Einfluss die Methylierung der CpG-Insel auf die Aktivität des ZNF423-Promotors hat. Zum anderen sollte in Methylierungsstudien geklärt werden, welche Bedeutung den von Harder et al. identifizierten, in ALL vorkommenden, aberranten Methylierungsmustern an spezifischen Positionen der ZNF423-CpG-Insel zukommt.

Um die Bedeutung der aberranten ZNF423-Expression für die Leukämogenese zu ermitteln, sollte in dieser Arbeit mittels *Transcription Activator-Like Effector* Nukleasen (TALENs) ein Knock-out sowie eine Gen-Modifikation von ZNF423 erwirkt werden. Ziel war es, die im *Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg* neuartige Arbeit mit den TALENs sowie geeignete Methoden zum Nachweis der Effekte der TALENs auf genomischer Ebene zu etablieren.

## **3 Einleitung**

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit dem Zinkfingerprotein ZNF423, welches zur Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie beitragen kann. Es wurden zum einen die Ursachen für die auffällig hohe Expression von ZNF423 in leukämischen Zellen untersucht. Zum anderen wurde der Versuch unternommen, das Zinkfingerprotein auszuschalten, um später Erkenntnisse über seine Rolle in der Entstehung der Leukämie ableiten zu können.

### **3.1 Akute Lymphatische Leukämie**

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters (Kaatsch 2013). Die altersspezifische Inzidenz für Kinder unter 5 Jahren liegt bei etwa 5/100.000, bei einer Gesamtinzidenz von etwa 1/100.000 (Gökbuget et al. 2012). Ohne geeignete Therapie führt eine ALL-Erkrankung innerhalb von kurzer Zeit zum Tode. Dank stetig verbesserter Behandlungsmethoden liegt die 5-Jahres-Überlebensrate heutzutage bei ca. 80 % (Pui et al. 2004).

#### **3.1.1 Definition**

Akute lymphatische Leukämien sind Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, bei denen es zu einer malignen Entartung von lymphopoetischen Zellen, sogenannten Lymphoblasten, kommt. Eines der wesentlichen Kennzeichen des leukämischen Phänotyps ist eine Differenzierungsblockade, die die Ausreifung der Lymphoblasten auf einer bestimmten Stufe der Entwicklung blockiert. Die entarteten Zellen verlieren die Fähigkeit zur Differenzierung und Apoptose. Dieser Selektionsvorteil bedingt unter anderem eine Proliferation und Akkumulation der Blasten im Knochenmark, wodurch die normale Blutbildung verdrängt wird. Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie sind die Folge (Gökbuget et al. 2012; Gökbuget 2007).

### 3.1.2 Klassifikation

Die maligne Entartung der lymphopoetischen Vorläuferzellen kann auf verschiedenen Stufen der Zellentwicklung stattfinden. Die Klassifikation der ALL richtet sich hierbei nach dem Zeitpunkt des durch die Entartung bedingten Reifungsarrestes. Außerdem erfolgt eine Unterteilung in Leukämien der B- oder T-Zelllinie. Anhand dieser Kriterien werden Leukämien in Pro-B-ALL, common ALL, Prä-B-ALL und reife B-ALL sowie in Pro- und Prä-T-ALL, intermediäre T-ALL und reife T-ALL eingeteilt (Gökbuget et al. 2012). In seltenen Fällen werden undifferenzierte oder bi-phänotypische akute Leukämien beobachtet (Creutzig et al. 1997).

### 3.1.3 Pathogenese

Die Ursachen der Entstehung der ALL sind vorrangig auf genetischer Ebene zu suchen. Als Ursache kommen sowohl strukturelle als auch numerische Chromosomenaberrationen in Frage. Auch Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen spielen eine Rolle bei der Entstehung der ALL (Pui et al. 2004). Neben genetischen Veränderungen, die zur Entwicklung einer ALL beitragen, können auch epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen.

#### 3.1.3.1 Chromosomenaberrationen

Sowohl strukturelle als auch numerische Chromosomenaberrationen können zur Entstehung der ALL beitragen. Die häufigste, in ca. 25 % der Fälle von kindlicher ALL auftretende, zytogenetische Veränderung ist die Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$ , die zu dem *TEL-AML1*-Fusionsgen führt (Harrison 2001). Das *TEL-AML1* Protein stellt einen aberranten Transkriptionsfaktor dar, der die Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen hinsichtlich Differenzierung und Überleben verändert (Pui et al. 2004). Die häufigste Chromosomenaberration bei der ALL des Erwachsenen ist die Philadelphia-Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$ , durch die es zur Fusion der Gene *BCR* und *ABL1* kommt (Gökbuget 2007). Bei *BCR* handelt es sich um eine sogenannte *breakpoint cluster region* und bei *ABL* um ein Protoonkogen namens *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, das eine Tyrosinkinase codiert. Das Fusionsprotein *BCR/ABL1* hat gegenüber der *ABL*-Tyrosinkinase eine höhere Kinaseaktivität, die der Regulation entzogen ist (Pui et al. 2008). Die onkogene Wirkung des Fusionsproteins

BCR/ABL1 kommt unter anderem über eine Interaktion der BCR-Domäne mit der *Src homology 2* (SH2)-Domäne des Proteins GRB2 zustande. Bei GRB2 handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Adapterprotein, welches mit SOS (*son of sevenless*), einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, assoziiert ist. SOS fördert den Austausch von einem Guanosindiphosphat (GDP) gegen ein Guanosintriphosphat (GTP) am RAS Protein und führt somit zu seiner Aktivierung. Über GRB2 und SOS besteht so eine Verbindung zwischen dem Fusionsprotein BCR/ABL1 und dem Protoonkogen *RAS* (Giubellino et al. 2008).

Im Gegensatz zur Philadelphia-Translokation, die bei der ALL des Erwachsenen die häufigste chromosomale Aberration darstellt, zeigen sich bei der ALL im Kindesalter häufig numerische Veränderungen des Karyotyps. Bei 25 % bis 30 % der Fälle von kindlicher B-ALL wird eine hohe Hyperdiploidie mit 51 bis 67 Chromosomen beobachtet, die mit guten Heilungschancen verbunden ist. In etwa 7 % der Fälle von ALL im Kindesalter findet sich eine Hypodiploidie mit weniger als 46 Chromosomen. Die Hypodiploidie ist mit sehr eingeschränkten Heilungschancen assoziiert (Braoudaki und Tzortzatou-Stathopoulou 2012).

### 3.1.3.2 Mutationen in Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen

Neben strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen können auch Mutationen in Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen zur Leukämogenese beitragen. Protoonkogene, bei denen es sich häufig um Gene handelt, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle regulieren, können durch Mutationen zu dauerhaft aktiven Onkogenen transformiert werden. Durch die ständige Aktivität oder Überexpression der Onkogene können Tumorzellen entstehen (Shortt und Johnstone 2012). In kindlicher ALL können beispielsweise *RAS* Proteine, eine Familie von G-Proteinen, von Mutationen betroffen sein. In 15% bis 22 % der Fälle kindlicher ALL kommt es zu Mutationen der Proteine *NRAS* oder *KRAS2*, welche in einer konstitutiven Aktivität dieser Proteine resultieren und zu einer aberranten Signalübertragung der *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalkaskade führen (Case et al. 2008). Neben der Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen, kann auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Leukämogenese beitragen. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressorgen *p53*, welches in 2 % bis 3 % der kindlichen ALL von Mutationen betroffen ist (Hof et al. 2011). Auch das Retinoblastom-Tumorsuppressorgen *RB1* kann verändert und inaktiviert sein.

Verschiedene Studien zeigen eine Inaktivierung des *RB1*-Gens bei 30 % bis 64 % der ALL Patienten und strukturelle Veränderungen des Gens bei 18 % der Patienten (Sauerbrey et al. 1998). Veränderungen des *RB1*-Gens zeigen sich gehäuft in niedrig hypodiploiden ALL, wohingegen sie bei fast haploiden ALL seltener auftreten (Holmfeldt et al. 2013).

### 3.1.3.3 Epigenetische Veränderungen

Der Begriff der Epigenetik beschreibt Modifikationen der Genexpression, die nicht durch Veränderungen der DNA (Desoxyribonukleinsäure) -Sequenz bedingt sind (Gökbuget 2007). Die wichtigsten epigenetischen Mechanismen sind die posttranslationale Histonmodifizierung und die DNA-Methylierung (Bernstein et al. 2007). Bei den beiden wichtigsten Wegen der Histonmodifikation handelt es sich um die posttranslationale Acetylierung oder Methylierung von Lysin-Resten an N-terminalen Histonenden. Ebenso wie die Histonmodifizierung durch Veränderung der Chromatinstruktur die Aktivität eines Gens beeinflussen kann, so kann auch die DNA-Methylierung Einfluss auf die Genaktivität nehmen (Esteller 2007). Im Säugetiergenom werden Cytosine in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) methyliert. Der größte Teil der CpG-Dinukleotide ist im adulten Organismus methyliert, wobei diese Methylierung zu einer Repression der Transkription und somit zu einer Unterdrückung der Genaktivität führt. CpG-Dinukleotide kommen gehäuft in sogenannten CpG-Inseln vor, bei denen es sich definitionsgemäß um mindestens 200 Basenpaare (bp) lange DNA-Abschnitte handelt, die sich meist in Promotorregionen befinden und einen regulierenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des zugehörigen Gens haben (Jones und Baylin 2002; Fazzari und Greally 2004). 40 % bis 45 % der humanen Gene weisen CpG-Inseln in ihren Regulationssequenzen auf (Knippers 2006). CpG-Inseln transkriptionell aktiver Gene sind meist nicht methyliert (Jones und Baylin 2002). Eine Methylierung von CpG-Inseln in gesunden Zellen tritt in der Regel nur bei der Inaktivierung des X-Chromosoms auf oder dort, wo Gene der genomischen Prägung unterliegen (Fazzari und Greally 2004). Im Rahmen von Krebserkrankungen kann es jedoch zu aberranter Methylierung dieser Promotorregionen kommen. Eine Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen kann mit einer Unterdrückung ihrer Aktivität in Tumorzellen einhergehen, wohingegen die Hypomethylierung der Promotorregionen von Onkogenen zu deren Aktivierung in malignen Zellen führen

kann. Ein Beispiel hierfür ist das *HOX11 (Homeobox gene 11)*-Protoonkogen, dessen proximaler Promotor in T-ALL einer starken Hypomethylierung unterliegt und das dadurch vermehrt exprimiert wird (Watt et al. 2000; Jones und Baylin 2002).

## **3.2 Hämatopoese**

Während der Hämatopoese erfolgt die Bildung reifer, funktionaler Endzellen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, sogenannten HS-Zellen (hämatopoetische Stammzellen). HS-Zellen zeichnen sich unter anderem durch ihre Fähigkeit aus, zu jeder Form der Blutzelle auszureifen. Außerdem besitzen HS-Zellen Telomeraseaktivität, die sie befähigt, sich selbst zu erneuern. Der Differenzierungsprozess beginnt mit der Entwicklung zur myeloischen oder lymphatischen Vorläuferzelle, aus der dann die Vertreter der myeloischen oder lymphatischen Reihe hervorgehen. Die myeloische Vorläuferzelle entwickelt sich zum Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten oder Erythrozyten. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle gehen B- und T-Zellen sowie natürliche Killerzellen hervor (Fey 2007).

### **3.2.1 B-Zell-Differenzierung**

Die im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen hervorgegangenen unreifen B-Zellen wandern in die Milz, wo sie sich zu reifen, naiven B-Zellen entwickeln. Diese Zellen migrieren schließlich in Lymphknoten, wo sie nach Antigenkontakt zu reifen, antikörperproduzierenden Plasmazellen werden.

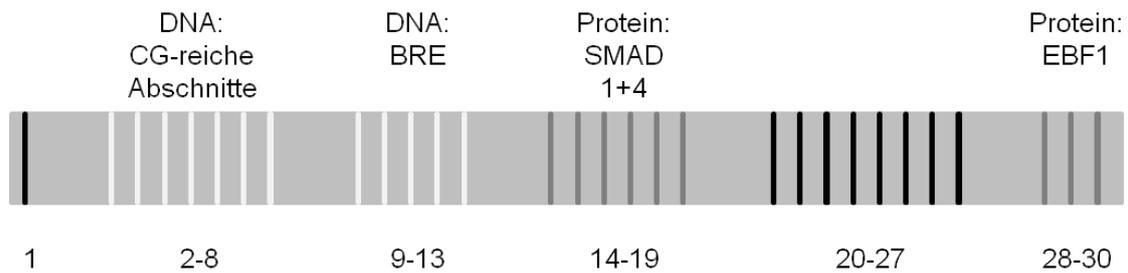
Ein entscheidender Schritt der B-Zell-Differenzierung ist die Entstehung des Immunglobulinrezeptors, der später für die Erkennung von Antigenmolekülen verantwortlich ist. Im Rahmen der Entstehung dieses Immunglobulinrezeptors kommt es zur Umlagerung von Genen, die die Bestandteile des Rezeptors codieren. Zunächst werden in der pro-B-Zelle die Gene für die schwere Immunglobulinkette des Rezeptors umgelagert. Sobald dies geschehen ist, kommt es in prä-B-Zellen zur Umlagerung der Gene für die Leichtketten des Rezeptors. Durch die in jeder Zelle stattfindende individuelle Genumlagerung entsteht eine Rezeptorvielfalt, welche gewährleistet, dass möglichst viele Antigene erkannt werden können.

Für die Klassifikation von B-Zell-Leukämien ist es von großer Bedeutung, dass jedem Reifungszustand einer B-Zelle eine bestimmte Kombination von Differenzierungsmarkern zugeordnet werden kann, sogenannte *cluster of differentiation (CD)*. Beispiele hierfür sind die Moleküle CD34+ und CD10, die auf frühen B-Zell-Vorläufern exprimiert werden, jedoch an späteren Punkten der B-Zell-Entwicklung nicht mehr nachweisbar sind. So wird CD34+ nur bis zu dem Punkt auf B-Zellen exprimiert, an dem es zur Expression der Immunglobulinschwerketten auf der B-Zell-Oberfläche kommt. Der Nachweis von CD10 ist nur so lange möglich, wie die B-Zellen noch keine Immunglobulinleichtketten produzieren. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse kann so von den auf der Zelloberfläche und zum Teil im Zytoplasma exprimierten Molekülen auf den Reifungszustand der B-Zelle geschlossen werden. Der Reifungszustand der leukämischen Zelle bestimmt mitunter die Wahl der Therapie (Fey 2007).

### **3.3 ZNF423**

ZNF423 ist ein Zinkfingerprotein der Krüppel-like C2H2-Zinkfingerprotein Familie, das als Transkriptionsmodulator in verschiedenen Signalwegen wirkt. Es handelt sich um das humane Homolog des erstmals im olfaktorischen System der Ratte identifizierten Transkriptionsmodulators Roaz (*Rat O/E-1-associated zinc finger protein*) (Hata et al. 2000; Tsai und Reed 1997; Turner und Crossley 1999). Synonyme Bezeichnungen für ZNF423 sind OAZ oder Olf-1/EBF (*Olfactory factor-1/ Early B-cell factor*)-assoziiertes Zinkfingerprotein. ZNF423 besteht aus 20 Zinkfingerdomänen, die in Cluster unterteilt sind. Die Zinkfinger 2-8 fungieren als DNA-Bindungsdomäne für CG-reiche Regionen der DNA. Zinkfinger 9-13 dienen als DNA-Bindungsdomäne an das BMP2 (*Bone morphogenetic protein 2*)-responsive element (BRE) für den im aktivierten BMP-Signalweg gebildeten Komplex aus ZNF423, SMAD1 und SMAD4. Über die Zinkfinger 14-19 kommt es zu einer Proteininteraktion mit SMAD1 und SMAD4 und über die Zinkfinger 28-30 zu einer Proteininteraktion mit EBF. Die Funktionen von Zinkfinger 1 und 20-27 wurden bisher nicht identifiziert (Hata et al. 2000).

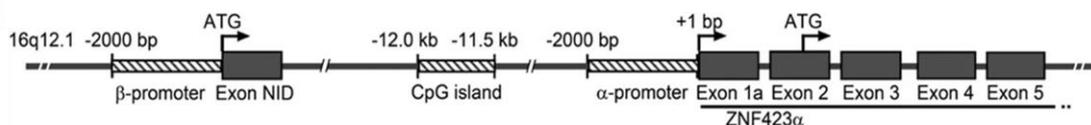
Der Aufbau von ZNF423 ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des ZNF423 $\alpha$ -Proteins. Die Balken repräsentieren die Zinkfinger. Oberhalb sind die Interaktionspartner der Zinkfinger beschrieben (modifiziert nach Harder 2012, Hata et al. 2000).

Harder et al. beschrieben 2013 eine zweite Isoform von ZNF423. ZNF423 $\beta$  unterscheidet sich durch eine NID (*NuRD interacting domain*) am N-Terminus von ZNF423 $\alpha$  und unterliegt der Kontrolle eines eigenständigen Promoters.

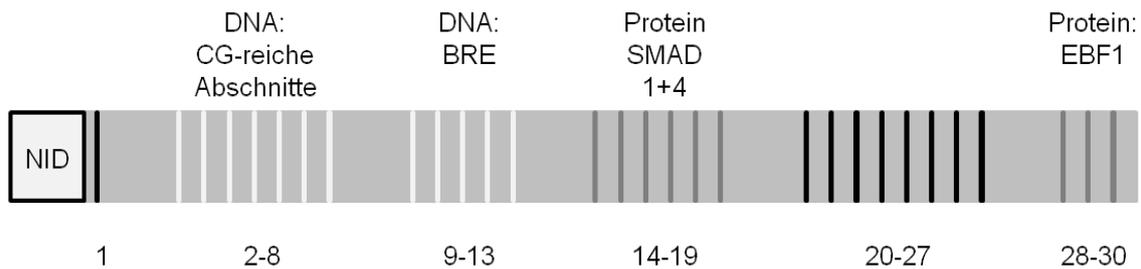
Abbildung 2 zeigt schematisch den Beginn des ZNF423-Gens mit den Promotorbereichen der Isoformen ZNF423 $\alpha$  und  $\beta$  sowie den jeweiligen codierenden Exons.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des Beginns des ZNF423-Gens. Die schwarzen Boxen markieren die Exons. Die gestrichelten Bereiche zeigen regulatorische Regionen (Promotor oder CpG-Insel). ZNF423 $\beta$  unterscheidet sich von ZNF423 $\alpha$  durch einen abweichenden Promotor sowie ein alternatives NID-codierendes erstes Exon (Harder et al. 2013).

Das alternative erste Exon codiert für eine *NuRD-interacting domain*, eine 12 Aminosäuren lange Sequenz, die in einer Reihe von Transkriptionsfaktoren vorkommt und in der Lage ist, den Mi-2/NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*)-Komplex zu binden (Harder et al. 2013; Lauberth und Rauchman 2006). Der Mi-2/NuRD-Komplex reguliert die transkriptionelle Aktivität von Genen auf epigenetischer Ebene. Er vereint Proteine zur Histondeacetylierung- und demethylierung sowie Proteine zur Umstrukturierung von Chromatin, wodurch er Einfluss auf die Chromatinstruktur und die damit verbundene Zugänglichkeit der DNA für die Transkription nehmen kann (Ramírez und Hagman 2009).

In Abbildung 3 ist die Proteinstruktur von ZNF423 $\beta$  schematisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des ZNF423 $\beta$ -Proteins. Die Balken repräsentieren die Zinkfinger. Oberhalb sind die Interaktionspartner der Zinkfinger beschrieben. Diese Isoform ZNF423 $\beta$  unterscheidet sich nur N-terminal durch eine *NuRD-interacting domain* (NID) von der ZNF423 $\alpha$ -Isoform (nach Gronemeyer und Zelent 2009).

Harder et al. identifizierten für ZNF423 eine CpG-Insel im Bereich zwischen den Promotoren der beiden Isoformen ZNF423 $\alpha$  und  $-\beta$ . In Reporterstudien zeigte die CpG-Insel eine aktivierende Wirkung auf die Reporteraktivitäten der Promotoren der jeweiligen Isoformen. In Knochenmarkszellen von Patienten mit ALL ist diese CpG-Insel im Vergleich zu gesunden Zellen oder Remissionsknochenmarkszellen stark hypomethyliert. Eine Bisulfidsequenzierung ergab, dass eine besonders starke Hypomethylierung für die Positionen 102, 183, 220 und 250 in der erwähnten CpG-Insel besteht (Harder et al. 2013).

Die Lage der CpG-Insel kann in Abbildung 2 nachvollzogen werden.

### 3.3.1 Interaktion ZNF423 - EBF

*Early B-cell factor (EBF) / Olfactory factor-1 (Olf-1)* ist ein Transkriptionsfaktor, der in B-Zellen, Adipozyten und im olfaktorischen System exprimiert wird. Die Expression im hämatopoetischen System ist hierbei auf die frühen Stadien der B-Zell-Differenzierung beschränkt. In reifen B-Zellen, T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zelllinien ist EBF physiologischerweise nicht exprimiert. In unreifen B-Zellen bindet EBF als Homodimer an den Promotor des *mb-1*-Gens und reguliert dessen transkriptionelle Aktivität. Das *mb-1*-Gen codiert das Ig- $\alpha$ -Protein, welches einerseits Immunglobuline (Ig) in der Plasmamembran verankert und andererseits an der intrazellulären Signalkaskade der membrangebundenen Ig-Rezeptoren beteiligt ist. Die Bedeutung von EBF für die B-Zell-Differenzierung wurde in einem EBF-Knock-out-Mausmodell gezeigt. Das Blut homozygot EBF-defizienter Mäuse enthielt keine reifen B-Zellen und im Serum konnte kein IgM nachgewiesen werden. Außerdem waren die

EBF-Knock-out-Mäuse signifikant kleiner und starben zu 30 % ohne erkennbaren Grund innerhalb der ersten vier Wochen (Hagman et al. 1995; Lin und Grosschedl 1995). Zunächst wurde in olfaktorischen Zellen gezeigt, dass die Aktivität von EBF unter anderem durch ZNF423 reguliert wird. ZNF423 interagiert mit EBF und verhindert dessen transaktivierende Wirkung auf EBF-Zielgene, indem es EBF in einem heteromeren Komplex fixiert und somit die für die DNA-Bindung notwendige Homodimerisierung verhindert (Tsai und Reed 1997). Harder et al. zeigten, dass auch in ALL-Zellen die beschriebene Interaktion zwischen EBF und aberrant überexprimiertem ZNF423 stattfindet und zur Leukämogenese beitragen kann (Harder et al. 2013).

### **3.3.2 ZNF423 als Cofaktor in der Signaltransduktion der BMPs**

Neben seiner regulatorischen Funktion für EBF spielt ZNF423 auch in der Signaltransduktion der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) als DNA-bindender Faktor eine Rolle. Bei den BMPs handelt es sich um Mitglieder der *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) Superfamilie, die als Regulatoren von Differenzierungs- und Wachstumsprozessen wirken (Hata et al. 2000). Ihrer Kontrolle unterliegen unter anderem die Zellproliferation und –morphogenese sowie die Apoptose. In Vertebraten spielen sie außerdem in der embryonalen Entwicklung fast aller Organe und Gewebe eine Rolle (Hogan 1996). Darüber hinaus beeinflussen BMPs auch das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (Bhatia et al. 1999). Die Signaltransduktion von BMPs erfolgt über transmembranöse Serin-Threonin-Kinaserezeptoren, welche das Signal an intrazellulär gelegene SMAD-Proteine übermitteln. SMAD-Proteine werden durch den Komplex aus BMP und Rezeptor an Serinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert, woraufhin sie in den Nukleus translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen. Da die DNA-Bindungsdomänen der SMAD-Transkriptionsfaktoren weder eine hohe Affinität noch Spezifität besitzen, wird die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen der Zielgene über andere DNA-bindende Cofaktoren gewährleistet. Einer dieser Cofaktoren ist ZNF423, der die SMAD-Proteine 1 und 4 über seine Proteininteraktionsdomäne binden kann.

Der Komplex aus ZNF423 und SMAD-Proteinen bindet dann über die DNA-Bindungsdomäne von ZNF423 an das *BMP responsive element* der Zielgene und führt zu einer Aktivierung der Transkription (Hata et al. 2000; Hogan 1996).

### **3.3.3 Bedeutung ZNF423 in ALL**

ZNF423 wird im gesunden, adulten Organismus in Lunge, Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Pankreas und der Niere exprimiert (Hata et al. 2000). Im Gegensatz zu der nicht vorhandenen Expression von ZNF423 in der gesunden Hämatopoese kommt es bei vielen ALL-Patienten zu einer aberranten Überexpression von ZNF423, die zu einem Maturationsarrest von B-Zellen in vivo führt. Dieser Maturationsarrest lässt sich über die Interaktion von ZNF423 mit EBF erklären und konnte in einem Maus-Xenotransplantationsmodell nachgewiesen werden (Harder 2012). In Studien war es bisher jedoch nicht möglich, die ZNF423-Überexpression in leukämischen Zelllinien mittels RNA (Ribonukleinsäure)- Interferenz aufzuheben, da die verwendeten shRNAs (*small hairpin RNA*) weder eine ausreichende noch eine stabile Repression des ZNF423 gewährleisten (unveröffentlichte Daten) (Zech 2012).

## **3.4 Transcription Activator-Like Effector Nucleases**

### **3.4.1 Möglichkeiten des Gen-Knock-downs und der Gen-Modifikation**

Die Repression von Genen, ein sogenannter Gen-Knock-down, ist wesentlich für das Verständnis von Genfunktion und wird heutzutage typischerweise mit siRNA (*small interfering RNA*) bzw. shRNA durchgeführt, wobei man sich den Mechanismus der RNA-Interferenz zu Nutze macht. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass der Knock-down unvollständig und unbeständig sein kann und zudem die Gefahr besteht, dass es zu unerwünschten Nebeneffekten (*off-target*-Effekten) kommt. Eine Alternative zur RNA-Interferenz bieten technisch konstruierte Nucleasen (engl. *engineered nucleases*), durch die ebenfalls ein Gen-Knock-down, aber auch eine Modifikation von Genen, erreicht werden kann (McMahon et al. 2012). Bei den 1996 erstmals beschriebenen Zinkfingernucleasen handelt es sich um Vertreter dieser Klasse, mit denen bereits große Erfolge auf dem Feld der Genmodifikation erzielt werden konnten (Baker 2012). So konnten Blutzellen mit Hilfe der Zinkfingernucleasen resistent gegen

das HI (Humanes Immundefizienz)- Virus gemacht werden. Trotz des großen Potenzials der Zinkfinger nukleasen stehen ihrer umfassenden Verbreitung Schwierigkeiten bei der Erzeugung neuer, spezifischer DNA-Bindungsdomänen im Wege, wodurch nicht jede DNA-Sequenz zum Ziel von Zinkfinger nukleasen gemacht werden kann (Christian et al. 2010; Isalan 2012). In letzter Zeit zeichnen sich zunehmend *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) als Alternative zu den Zinkfinger nukleasen ab. Sie können, im Gegensatz zu Zinkfinger nukleasen, so entworfen werden, dass sie nahezu jede DNA-Sequenz als Ziel erkennen (Joung und Sander 2013).

### **3.4.2 Funktion von TALENs**

TALENs sind in der Lage an spezifischen, zuvor festgelegten Stellen der DNA Doppelstrangbrüche (DSB) zu erzeugen. Im Rahmen der zelleigenen Reparaturprozesse kann es dann zu Veränderungen der DNA-Sequenz am Ort des Doppelstrangbruchs kommen, wodurch ein Gen-Knock-out einerseits oder eine Gen-Modifikation andererseits bewirkt werden kann (Cermak et al. 2011).

### **3.4.3 Aufbau von TALENs**

Die TALENs sind sequenzspezifische Nukleasen, die aus der Fusion eines *Transcription Activator-Like Effectors* (TALEs) und einer Nuklease (N) hervorgehen (Cermak et al. 2011). Der TALE ist für die DNA-Bindung verantwortlich, während die Nuklease die DNA nicht-spezifisch schneidet (Joung und Sander 2013).

#### **3.4.3.1 Der Transcription Activator-Like Effector in TALENs**

Bei TALEs handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die in dem Pflanzenpathogen *Xanthomonas* entdeckt wurden. *Xanthomonas* übermittelt die TALEs in Pflanzenzellen, wo sie in den Nukleus gelangen und durch Bindung an Promotorsequenzen zu einer Modulation der Transkription von Wirtsgenen führen. Jeder TALE besteht aus einer Reihe von sich wiederholenden Sequenzabschnitten aus 33 bis 35 Aminosäuren, den sogenannten *repeat units*. Die *repeat units* weisen, mit Ausnahme der Aminosäuren 12 und 13, eine hohe Ähnlichkeit untereinander auf. Bei den Aminosäuren 12 und 13 handelt es sich um die sogenannten *Repeat-Variable Di-residues* (RVDs), die für die spezifische

DNA-Bindung verantwortlich sind. Jede *repeat unit* erkennt dabei über sein RVD ein einzelnes Basenpaar einer zusammenhängenden DNA-Sequenz (Christian et al. 2010).

### 3.4.3.2 Die Nuklease in TALENs

Die katalytische Domäne der TALENs ist eine FokI-Endonuklease, die aus *Flavobacterium okeanokoites* isoliert wurde. FokI besteht aus zwei Domänen. Die N-terminal gelegene DNA-Bindungsdomäne erkennt die fünf Basen lange Sequenz 5'-GGATG-3'. Die C-terminal gelegene Spaltungsdomäne schneidet DNA-Doppelstränge 9 bis 13 bp von der Erkennungsregion entfernt. Die FokI-Endonuklease liegt als inaktives Monomer vor, dimerisiert erst nach Bindung an die DNA und geht dadurch in ihre aktive Form über (Li et al. 2011).

Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau einer einzelnen TALEN.

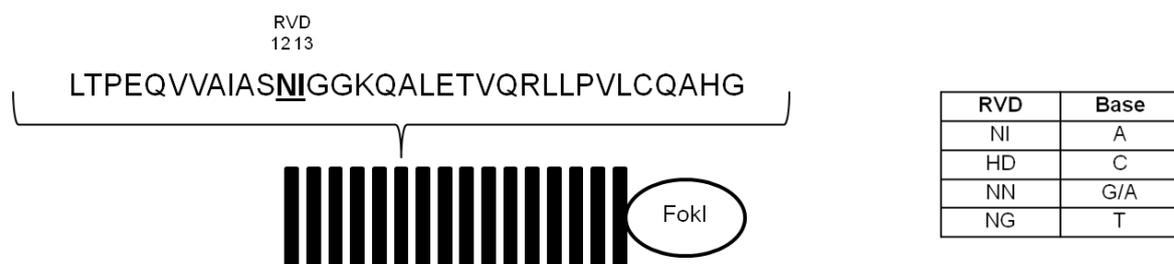


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALEN). Es handelt sich um ein Fusionsprotein aus *Transcription Activator-Like Effector* (TALE) und einer FokI-Nuklease. Die Balken symbolisieren den TALE. Jeder Balken steht für einen Abschnitt aus 33-35 Aminosäuren, ein sogenanntes *repeat unit*. Die Aminosäuren eines *repeat units* sind oberhalb des TALE in der Klammer dargestellt. Die Tabelle zeigt welcher Repeat-Variable-Di-residue (RVD) welche Base der DNA erkennt und zu einer Bindung des TALEN an die DNA führt (RVDs: N=Asparagin, I=Isoleucin, H=Histidin, D=Asparaginsäure, G=Glycin. Basen: A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin.) (modifiziert nach Miller et al. 2011).

### 3.4.3.3 Funktionsweise der TALENs

TALENs können immer nur als Paar wirken, da die katalytische FokI-Domäne nur in dimerisierter Form DNA spalten kann. Die TALENs binden zunächst über die TALE-Komponente an die DNA. Im nächsten Schritt entsteht eine sogenannte *spacer-Region*, die es den beiden Endonuklease-Domänen ermöglicht, zu dimerisieren und einen DNA-DSB zu erzeugen. Im Anschluss kommt es zur Reparatur des durch die TALENs generierten Doppelstrangbruchs durch die zelleigenen Reparaturmechanismen der Homologen Rekombination (HR) und der Nichthomologen Endverknüpfung (*Non-homologous endjoining*, NHEJ) (Cermak et al. 2011).

#### **3.4.4 Nichthomologes ‚Endjoining‘**

Das nichthomologe ‚Endjoining‘ ist das in Säugetieren am häufigsten vorkommende Prinzip zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Zunächst binden die Ku-Proteine 70 und 80 an die durch den DSB freiliegenden DNA-Enden. An den entstandenen Komplex aus DNA und Ku-Proteinen binden anschließend Enzyme und Proteine, wodurch der Abbau der freien DNA-Enden durch Nukleasen und die Replikation und Transkription des betroffenen Bereiches verhindert wird. Die freien Enden des Doppelstrangbruchs werden anschließend von der Ligase IV verknüpft. Das NHEJ ist ein sehr fehleranfälliger Mechanismus, bei dem es zu Mutationen der DNA kommen kann (Grundy et al. 2014; Pardo et al. 2009).

#### **3.4.5 Homologe Rekombination**

Im Gegensatz zum fehleranfälligen NHEJ können mittels Homologer Rekombination auch komplexere DNA-Schäden repariert werden (Kauffmann et al. 2006). Bedingung für die Durchführung der Homologen Rekombination ist das Vorhandensein einer Reparaturvorlage, die homolog zu dem geschädigten Bereich der DNA sein muss. Anhand der homologen Reparaturvorlage kann die geschädigte DNA-Sequenz resynthetisiert und der DSB repariert werden. Im ersten Schritt kommt es zur Bildung des MRN-Komplexes aus den Proteinen RAD50, MRE11 und NBS1, welcher den DSB erkennt und gemeinsam mit anderen Nukleasen den DNA-Doppelstrang am 5'-Ende des DSB abtrennt. Die hierdurch entstandenen 3' DNA-Überhänge werden von RPA (*replication protein A*) besetzt. Im nächsten Schritt kommt es zur Bildung von Filamenten um den 3'-Überhang durch RAD51, die die Stranginvasion der intakten Reparaturvorlage ermöglichen. Nach der Stranginvasion werden die 3' Überhänge anhand der Reparaturvorlage durch eine Polymerase verlängert und die Enden durch DNA Ligase I verbunden. Die durch die Stranginvasion entstandenen *Holiday junctions*, kreuzförmige Strukturen, die entstehen, wenn zwei DNA-Doppelstränge zum Austausch von genetischen Segmenten in vier Stränge aufgeteilt werden, werden nach Abschluss der Reparatur wieder aufgelöst (Grundy et al. 2014; Pardo et al. 2009; Khanna und Jackson 2001).

### 3.4.6 TALEN Gen-Knock-out

Setzt nach dem TALEN-induzierten DSB der Reparaturmechanismus des NHEJ ein, so kommt es durch die Fehlerträchtigkeit dieses Mechanismus bei einem Teil der Reparaturvorgänge zu Mutationen an der Stelle des originalen Doppelstrangbruchs. Diese Mutationen können zu einem Verlust der Genfunktion und somit zu einem Gen-Knock-out führen (Cermak et al. 2011).

In Zebrafischen konnten durch den Einsatz von TALENs und nachfolgendem NHEJ vererbare Inaktivierungen der Gene *tnikb* und *dip2a* erzeugt werden (Huang et al. 2011).

### 3.4.7 TALEN Gen-Modifizierung

Eine Modifikation von Genen kann mit Hilfe der TALENs erreicht werden, wenn es nach dem von den TALENs induzierten DSB zur Homologen Rekombination kommt. Die hierfür benötigte Reparaturvorlage kann in der Zelle als Plasmid bereitgestellt werden. Um das Gen im Rahmen der Homologen Rekombination zu verändern, muss die Reparaturvorlage sowohl mit der Zielsequenz homologe als auch heterogene Bereiche beinhalten, die die gewünschte Mutation tragen.

Hockemeyer et al. zeigten 2011, dass eine Genmodifikation in embryonalen Stammzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen durch Anwendung von TALENs mit nachfolgender HR unter Bereitstellung einer homologen Reparaturvorlage möglich ist. Die Gene *PPP1R12C*, *OCT4* und *PITX3* der Stammzellen wurden hierbei durch die gezielte Integration von GFP (*green fluorescent protein*) modifiziert (Hockemeyer et al. 2011).

### 3.4.8 CEL-1 Assay zum Nachweis des Gen-Knock-outs auf genomischer Ebene

Bei dem CEL-1 Assay handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von Punktmutationen. Grundlage dieses Assays ist die *Surveyor* Nuklease, ein Mitglied der Gruppe der pflanzlichen CEL (*celery*)- Endonukleasen. Die Nuklease erkennt Punktmutationen in DNA-Doppelsträngen und schneidet beide DNA-Stränge 3' von der Mutation (Voskarides und Deltas 2009). Der Bereich der DNA, der auf Mutationen untersucht werden soll, wird zunächst mittels PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert. Anschließend wird in einem Hybridisierungsvorgang das zu untersuchende PCR-Produkt mit einem Referenz

PCR-Produkt hybridisiert. Weist das zu untersuchende PCR-Produkt gegenüber dem Referenz PCR-Produkt eine Punktmutation auf, so entstehen im Rahmen dieser Hybridisierung sowohl Homoduplexe als auch Heteroduplexe. Die Hybridisierungsansätze werden anschließend mit der CEL-1-Nuklease verdaut und die Proben auf einem Agarosegel analysiert. Anhand der Anzahl der Banden einer Probe kann entschieden werden, ob Punktmutationen vorhanden sind. Die Intensität der einzelnen Banden gibt zusätzlich näherungsweise Aufschluss darüber, wie groß der Anteil der mutierten DNA an der gesamten untersuchten DNA ist. So kann beurteilt werden, ob eine Mutation nur ein Chromosom oder beide betrifft. Der CEL-1 Assay bietet die Möglichkeit die Punktmutationen, die nach TALEN-induziertem DSB und NHEJ entstehen, auf genomischer Ebene nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der aberranten Hypomethylierung der CpG-Insel von ZNF423 auf die Expression des Zinkfingerproteins mittels Mutagenesestudien und Reporteranalysen untersucht.

Des Weiteren wurde mittels TALEN der Versuch unternommen, einen Knock-out und eine Modifikation des ZNF423-Gens zu erreichen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Die Chemikalien für die Standardmethoden wurden bei *Merck*, *Roth* und *Sigma Aldrich* erworben. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) oder mit Wasser für Injektionszwecke (*Braun*) angesetzt.

### 4.2 Kits

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Kits.

Name des Kits	Hersteller
Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega
SURVEYOR® Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis	TRANSGENOMIC
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Expand High Fidelity PCR System	Roche
TA Cloning Kit	Invitrogen
Amaxa™ Cell Line Nucleofactor™ Kit R	Lonza
Amaxa™ Cell Line Nucleofactor™ Kit V	Lonza
Amaxa™ Human CD34 Cell Nucleofactor™ Kit	Lonza
LightCycler® Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I	Roche
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

### 4.3 Biologisches Material

#### 4.3.1 Bakterien

Es wurden die kompetenten *E. coli* (*Escherichia coli*) Bakterienstämme *OneShot TOP10* und *OneShot PIR1* der Firma *Invitrogen* sowie *XL10-Gold* von *Agilent Technologies* verwendet.

### 4.3.2 Zelllinien

Die Angaben zu den verwendeten Zelllinien wurden der Datenbank des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH und der Datenbank der American Type Culture Collection (ATCC) entnommen.

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Anmerkung
293T (ACC 635)	adhärente Zelllinie, humane embryonale Niere, Derivat der Zelllinie 293
U2OS 697 (ACC 42)	adhärente Zelllinie, humaner Knochen, Osteosarkom Suspensionszelllinie, humane B-Zellvorläuferleukämie, trägt die Translokation t(1;19), die das Fusionsgen E2A-PBX1 (TCF3-PBX) bedingt
REH (ACC 22)	Suspensionszelllinie, humane B-Zellvorläuferleukämie, trägt die Translokation t(12;21), die das Fusionsgen TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) bedingt

### 4.3.3 Primäres Material

Bei der verwendeten Buffy-DNA handelt es sich um genomische DNA aus Leukozytenpräparaten aus humanem peripherem Blut gesunder Spender *des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf*.

Die primäre Leukämie 8353 stammt aus der Gewebebank der *Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf*. Das humane Primärmaterial wurde nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Spender bzw. ihrer gesetzlichen Vertreter asserviert. Die Verwendung dieses Materials für dieses Forschungsprojekt wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer der Stadt Hamburg genehmigt (WF-050/08). Bei der verwendeten primären Leukämie handelt es sich um eine common ALL eines männlichen Patienten.

## 4.4 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 3: Übersicht der Medien und Reagenzien, die für die Zellkultur verwendet wurden.

Produkt	Hersteller	Anmerkung
DMEM	Gibco/Invitrogen	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
IMDM	Gibco/Invitrogen	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
FCS	Gibco/Invitrogen	Fetales Kälberserum
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen	200mM
HEPES Buffer Solution	PAA	1M, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Natriumpyruvat	Gibco/Invitrogen	100mM
PBS	Gibco/Invitrogen	<i>Phosphate buffered saline</i>
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen	Penicillin: 10000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml
MethoCult™ SF H4236	STEMCELL Technologies	Serum freies methylzellulose-basiertes Medium ohne Zytokine oder Epo
hFlt3-L	CellSystems	Humaner Flt-3 Ligand
hSCF	CellSystems	Humaner Stammzellfaktor
hTPO	CellSystems	Humanes Thrombopoetin
hIL6	CellSystems	Humanes Interleukin 6

## 4.5 Molekularbiologie

### 4.5.1 Expressionsplasmide

Als Expressionsplasmid wurde der pcDNA3.1(+)-Vektor der Firma *Invitrogen* verwendet. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette. Des Weiteren wurde der Vektor pcDNA3.1(+)\_ZNF423 verwendet, bei dem es sich um einen pcDNA3.1(+)-Vektor handelt, in den ZNF423 hinein kloniert wurde. Dieser Vektor lag schon vor Beginn dieser Arbeit vor. Außerdem wurde das Plasmid pLKO1\_shRNA\_scr\_YFP (Broad Institute, Harvard Medical School Boston, lizenziert an *Sigma Aldrich*) verwendet.

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten *Transcription Activator-Like Effector Nucleasen* (TALENs) handelt es sich um die Plasmide pTAL.CMV.T7.v2.019371 (bezeichnet als „TALEN links“) mit der RVD-Aminosäuren-Sequenz NN-NI-HD-NI-NI-NN-NG-HD-NI-NI-NN-NI-NN-NN-NI-NG und pTAL.CMV.T7.v2.019382 (bezeichnet als „TALEN rechts“) mit der RVD-Sequenz NG-HD-NI-NG-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NG-NN-NG-HD-NG-NG.

## 4.5.2 Plasmide für Reporteranalysen

Tabelle 4: Übersicht der Plasmide, die für Reporteranalysen verwendet wurden. Die Plasmide pCpGL basic und pCpGL CMV wurden von Dr. Michael Rehli vom Klinikum der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

Vektorbezeichnung	Anmerkung	Hersteller	Resistenz
pCpGL basic	Leervektor		Zeocin
pCpGL CMV	Positivkontrollvektor		Zeocin
pRL-TK Vektor	Renilla-Vektor	Promega	Ampicillin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\beta$	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _del 183	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _del 220	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _del 250	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _del 102/183/220/250	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _HhaI 183	Analysevektor		Zeocin
pCpGL CpG_ZNF423 Promotor $\alpha$ _HhaI 250	Analysevektor		Zeocin
pGL3 basic	Leervektor	Promega	Ampicillin
pGL3 Kontrollvektor	Positivkontrollvektor	Promega	Ampicillin
pGL3 CD79b Promotor	Analysevektor		Ampicillin
pcDNA3.1(+)_ZNF423_Delation+Insertion EcoRV_YFP_stop	Analysevektor		Ampicillin
pcDNA3.1(+)_ZNF423_Delation+Insertion EcoRV_YFP_stop-ex	Analysevektor		Ampicillin
pcDNA3.1(+)_EBF	Analysevektor		Ampicillin
pcDNA3.1(+)_ZNF423	Analysevektor		

## 4.5.3 Weitere verwendete Plasmide

Für die Etablierung des CEL-1 Assays wurden die Plasmide pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 verwendet.

#### 4.5.4 Medium für die Bakterienkultur

Bakterien wurden in flüssigem Medium oder auf Agarplatten kultiviert. Eine Ampicillin-Selektion erfolgte in *Luria-Bertani* (LB)-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt wurden. LB-Medium wurde hergestellt, indem *Difco LB Broth Miller (BD)* nach Angaben des Herstellers in ddH<sub>2</sub>O gelöst und 20 min bei 121 °C autoklaviert wurde. Für eine Zeocin-Selektion wurde *low-salt*-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 5 g/l Natriumchlorid) verwendet. Diesem wurden 25 µg/ml Zeocin (*Invitrogen*) hinzugegeben.

#### 4.5.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (*OneShot TOP10* und *OneShot PIR1* der Firma *Invitrogen* sowie *XL10-Gold* von *Agilent Technologies*) erfolgte mit Hilfe der Hitzeschockmethode. Hierzu wurde zunächst 2 µl β-Mercaptoethanol zu den *E. coli* gegeben und die Bakteriensuspension anschließend mit 2 µl der zu transformierenden DNA vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C. Der Ansatz wurde dann für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.5.6 Mutagenese

Einzelne DNA-Mutationen wurden mit dem *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*) oder dem *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*) in Plasmide eingebracht. Um mehrere Mutationen gleichzeitig zu erzielen, wurde das *QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*) genutzt. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die mutierte, Dpn-1 verdaute DNA wurde in *E. coli* transformiert.

**Tabelle 5: Übersicht der Primer, die für Mutagenese-Reaktionen verwendet wurden.**

Name Primer	fw 5'-3'	rev 5'-3'
CpG_102_mutA	GTCCCGGGGCAGCCCCCGC GG	CCGCGGGGGCTGCCCGGGAC
CpG_183_mutA	CGGGTAGCTGGGAGGGAAG AGCCCC	GGGGCTCTTCCCTCCCAGCTAC CCG
CpG_220_mutA	CCCCTGATTTTCCCAGCCTCT TCCCAGCC	GGCTGGGAAGAGGCTGGGAAA ATCAGGGG
CpG_250_mutA	CCCCTCTTCCCAGCCTCCTC CCC	GGGGAGGAGGCTGGGAAGAGG GG
CpG_183_Hhal	GTAGCTGGGCGCGAAGAGC CCCG	CGGGGCTCTTCGCGCCCAGCTA C
CpG_250_Hhal	CCCCCTCTTCCGCGCCTCCT CCC	GGGAGGAGGCGCGGAAGAGGG GG
EcoRV_insert_ OAZ	TGGAAGACAGGAACAGCGTG ACAGATATCAGTCAAGAGGA G	CTCCTCTTGACTGATATCTGTCA CGCTGTTCTGTCTTCCA
EcoRV_delet_ pcDNA	GGCGAATTCTGCAGAATCCA GCACAGTGGC	GCCACTGTGCTGGATTCTGCAG AATTCGCC
Stop-weg_ YFP_NEU3	TGGACGAGCTGTACAAGGAT ATCAGTCAAGAGGA	TCCTCTTGACTGATATCCTTGTA CAGCTCGTCCA
Stop weg Matrix	TGGACGAGCTGTACAAGAGA TATCCATCACACTG	ACCTGCTCGACATGTTCTCTATA GGTAGTGTGAC

#### 4.5.7 Plasmidisolation

Um Plasmide aus Bakterien zu isolieren, wurden Kits zur Mini- und Maxipräparation verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet und im letzten Schritt jeweils in Wasser eluiert. Geringe Mengen Plasmid wurden mit Hilfe des *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)* aus 1,5 ml Bakteriensuspension isoliert. Für größere Plasmidmengen wurden 100 ml Bakterienkultur eingesetzt und das *Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)* verwendet. Zur endotoxinfreien Maxipräparation wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)* genutzt.

#### 4.5.8 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifizierung einzelner DNA-Fragmente eingesetzt. Es wurde dabei mit der *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* oder dem *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* gearbeitet. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in einem *96-Well TProfessional Thermocycler* von *Biometra*. Die Annealingtemperatur lag in der Regel bei 60 °C.

**Tabelle 6: Übersicht der Primer, die für Polymerase-Kettenreaktionen verwendet wurden.**

Primer	Sequenz 5'-3'
OAZ_SNP_PCR_fw	CAGAGCCACACATGTCAGATCTGC
OAZ_SNP_PCR_rev	ACTTCTTGCTGTGGGCCAGTGGAA
Matrix upstream_fw	TGTGTTAGGAACAGCTGATGGAGGCTT
Matrix upstream_rev	TGTCACGCTGTTCCCTGTCTTCCAG
YFP_matrix_fw	AAGATATCATGGTGAGCAAGGGCGAG
YFP_matrix_rev	AAGATATCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Matrix downstream_fw	AACTCGAGGAGGATGAATCAATTTACACCT
Matrix downstream_rev	AACTCGAGCTGCGTTTTCCAAAAGGC
OAZ_Cel1_fw	CGTGTGAGAGAATTATGGCACCACATGCTA
OAZ_Cel1_rev	ACCACCTGTCAGAGTCCTGGGG
CEL-1 fw neu	AGAGATCTCCCAGCTCTA AATTGCAAGG
CEL-1 rev neu	CTGCCTGCCGGAAAGCTGTTGCTT
HEK CEL-1 fw	GATGTGGAGGTGTCTTCCCCGAAG
HEK CEL-1 rev	CATGGCTGTTAGGTGCCTCAGGGT
Genotyp up neu fw	TAATGGTGGCTTTGAAGAAGCACGGAACA
Genotyp YFP_rev	CCGTCCAGCTCGACCAGGATG
Genotyp down neu rev	CAGATGTCACTAGAGGGCAAATCATAGCA
OAZ_Exon4_fw	GAGGCCTAGAAGGAGAGCCAG AG
OAZ_Exon4_rev	CTCCAGGACAGCGGTGGGC
OAZ_Exon5_fw	ATGGGTGATGACGACCCACAACCTCTC
OAZ_Exon5_rev	CGGCTCCTCTTGTGCTTGAAGAG

#### 4.5.9 PCR-Purification

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick *PCR Purification Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA in Wasser eluiert.

#### 4.5.10 Sequenzieren

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde mit dem *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* oder dem *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die Reaktionsansätze wurden in den Laboren der *Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf* analysiert.

**Tabelle 7: Übersicht der Primer, die für Sequenzierungen verwendet wurden.**

Primer	Sequenz 5'-3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
pCpGL fw	GAACTAATTGAATTGATACCTGTAAAG
CpGOAZ 128 fw	TCCCGAGGCGCACATCTGGC
OAZ_Prom 332 fw	CAAAGCATTGGTGGTGGGTCTGTG
CpGOAZ 435 fw	AGCGCGTTCCCAATGCCGCC
OAZ_Prom 724 fw	GAGGACAAGTGAGATTCTAAGCAGCGAT
OAZ_Prom 1075 fw	CATTCAGACTGGGCATGGTGGCTC
OAZ_Prom 1421 fw	TGGGAGATAGAATGAGACCCCAACTCA
OAZ_Prom 1676 fw	GAGGGGTGGGGGAAGTGGTGAA
Sequ-Matrix 1	TGGCACCACATGCTACAAAAAACCCC
Sequ-Matrix 2	GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG
Sequ-Matrix 3	GACGGCAACATCCTGGGGCACA
Sequ-Matrix 4	TCAATTTACACCTGCGATCACTGTCAGCA
Sequ-Matrix 5	AGGAATTAGATGGTGGTGTCTGTCC
YFP LC F	AGGTGAAGTTCGAGGGCGAC

#### 4.5.11 Methylierung

DNA-Methylierungen erfolgten mit den Methyltransferasen SssI und HhaI (*New England Biolabs*). Es wurde ein 30 µl Reaktionsansatz bestehend aus der Methyltransferase, dem entsprechenden Puffer, S-Adenosylmethionin (SAM, 160 µM), H<sub>2</sub>O und der zu methylierenden DNA erstellt. Zu jeder Probe wurde eine Kontrollprobe erstellt, der kein SAM hinzugefügt wurde. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach 2 h nochmals die zu Beginn eingesetzte Menge SAM hinzugefügt wurde. Die methylierte DNA wurde anschließend mit dem *PCR Purification Kit* (*QIAGEN*) aufgereinigt. Der Erfolg der Methylierung konnte durch einen Restriktionsverdau mit dem methylierungssensitiven Enzym HhaI (*Thermo SCIENTIFIC*) überprüft werden. Zur Kontrolle erfolgte gleichzeitig ein Verdau mit MspI (*Thermo SCIENTIFIC*), einem methylierungsresistenten Restriktionsenzym.

#### 4.5.12 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA erfolgte mit *FastDigest*<sup>®</sup>-Restriktionsenzymen von *Fermentas* nach Angaben des Herstellers. Um die verdaute DNA ihrer Länge nach aufzutrennen, wurden in der Regel 1 %-ige Agarosegele bestehend aus TAE-Puffer und Agarose verwendet. Die Gele wurden anschließend mittels UV-Licht im *BioDocAnalyzer* (*Biometra*) ausgewertet.

#### **4.5.13 Gelextraktion**

Für die Isolation von DNA aus einem Gel wurde zunächst die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend nach Herstellerangaben mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (*QIAGEN*) aus dem Gel extrahiert und in Wasser eluiert.

#### **4.5.14 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung**

Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA erfolgten am *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo SCIENTIFIC*).

#### **4.5.15 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben mit dem *TRIZOL<sup>®</sup>* Reagenz (*Invitrogen*) durchgeführt. Hierzu wurden Suspensionszellen bei 2000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in *TRIZOL<sup>®</sup>* resuspendiert. Bei adhärenenten Zellen wurde, nach Entfernung des Mediums, *TRIZOL<sup>®</sup>* direkt auf die Zellen gegeben. Die isolierte RNA wurde in RNase freiem Wasser aufgenommen und entweder bei -80 °C eingefroren oder im Anschluss in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben.

#### **4.5.16 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurden 3 µg RNA eingesetzt und so in Wasser aufgenommen, dass das Endvolumen 35 µl betrug. Anschließend wurden 1 µg *Random Primers* (*Promega*) und 5 µl *peqGOLD dNTP Mix* (*Peqlab*) zugesetzt und die Lösung zunächst für 5 min bei 70 °C und anschließend für 5 min bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 10 µl 5x *M-MLV Reverse Transkriptase Puffer*, 1 µl *RNasin Plus RNase Inhibitor* und 1 µl *M-MLV Reverse Transkriptase* (alle *Promega*) hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für 1 h bei 37 °C und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

#### **4.5.17 TA-Klonierung**

Mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem *TA Cloning Kit (Invitrogen)* in den *pCR<sup>®</sup>2.1 Vektor (Invitrogen)* kloniert. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in *One Shot<sup>®</sup> TOP 10 Competent Cells (Invitrogen)* transformiert.

#### **4.5.18 Ligationen**

Ligationen wurden mit der *T4 DNA Ligase (Roche)* durchgeführt. Es wurde ein 20 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,1 µl *T4 DNA Ligase* und 4 µl 10-fach Ligationspuffer erstellt, in den der Vektor und das Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt wurden. Der Ansatz wurde mindestens 4 h, in der Regel jedoch über Nacht, bei Raumtemperatur inkubiert.

Für Dephosphorylierungen im Rahmen von Ligationen wurde die *Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* der Firma *THERMO SCIENTIFIC* verwendet.

#### **4.5.19 CEL-1 Assay**

Zum Nachweis von Punktmutationen wurde das *SURVEYOR<sup>®</sup> Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis (TRANSGENOMIC)* verwendet. In die PCR wurden 100 ng genomische DNA eingesetzt und mit dem *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel analysiert. Entstand neben dem gewünschten PCR-Produkt noch ein Nebenprodukt, so wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein weiteres Gel aufgetragen, die Bande mit der erwarteten Länge aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend in 1\*Puffer des *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* resuspendiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend hybridisiert, mit *SURVEYOR<sup>®</sup>* Nuklease behandelt und auf einem Agarosegel analysiert.

#### 4.5.20 qPCR

Zur relativen Quantifizierung von mRNA (*messenger RNA*) -Mengen wurde die quantitative real time PCR eingesetzt. Die Bestimmung wurde mit dem *LightCycler® Fast Start DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I Kit (Roche)* im technischen Triplikat am *LightCycler 480 (Roche)* durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurde die *LightCycler 480 software (Roche)* genutzt. Es wurden die relativen Expressionen der Proben untereinander verglichen, wozu der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Wert mit Hilfe der Software berechnet wurde.

Tabelle 8: Übersicht der Primer, die für real time PCRs verwendet wurden.

Name Primer	5'-3' Sequenz
ZNF423_fw	GCAGACCTGACGGACCAC
ZNF423_rev	AGGCCACCCAGGAGAGTT
β2M_fw	TTCTGGCCTGGAGGCTATC
β2M_rev	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC
EBF_fw	TCTCTACAGCAATGGGATAAGGA
EBF_rev	TCTTGGCCTTCATACACTATGG
CD79a_fw	CAAGAACCGAATCATCACAGC
CD79a_rev	CGTTCTGCCATCGTTTCC
CD79b_fw	TTGCTGCTGCTGCTCTCA
CD79b_rev	CGCGAACAAGCACTACCTTT

#### 4.5.21 Erstellung des Vektors pCR2.1\_Matrix

Die einzelnen Fragmente der als Reparaturvorlage für die Homologe Rekombination dienenden „Matrix“ wurden in einen pCR2.1 Vektor kloniert. Bei pCR2.1 handelt es sich nicht um einen Expressionsvektor. Als Erstes wurden die Fragmente „upstream“, „YFP“ und „downstream“ mittels PCR aus geeigneten DNA-Vorlagen amplifiziert. Ein Überblick über die einzelnen Fragmente sowie die für die PCR genutzten DNA-Vorlagen und Primer sind in Anhang 1 aufgeführt. Die Primer waren so gestaltet, dass sich nach der PCR an den Enden des YFP-Amplifikates Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRV und an den Enden des downstream-Amplifikates Schnittstellen für das Restriktionsenzym XhoI befanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte einzeln in den pCR2.1-Vektor ligiert, sodass die Vektoren pCR2.1\_upstream, pCR2.1\_YFP und pCR2.1\_downstream entstanden. YFP wurde dann mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRV aus dem Vektor pCR2.1\_YFP wieder herausgeschnitten, über ein Gel aufgereinigt und in den von EcoRV

aufgeschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten pCR2.1\_upstream-Vektor hinein ligiert, wobei der pCR2.1\_upstream+YFP entstand. Downstream wurde hieraufhin durch einen Restriktionsverdau mit XhoI aus dem pCR2.1\_downstream-Vektor herausgeschnitten, über ein Gel aufgereinigt und in den von XhoI geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten pCR2.1\_upstream+YFP-Vektor ligiert, wodurch pCR2.1\_Matrix entstand.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie die genauen Reaktionsbedingungen sind in Anhang 2 aufgeführt.

#### **4.5.22 Erstellung der Vektoren pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex**

Die für die Arbeiten mit den TALENs benötigten Kontrollvektoren pcDNA3.1(+)\_YFP-stop und pcDNA3.1(+)\_YFP-stop-ex wurden erstellt, indem zunächst YFP mittels PCR aus einem pLKO1\_shRNA\_scr\_YFP-Plasmid amplifiziert wurde, wobei die Primer für diese PCR so gestaltet waren, dass sich an den Enden des Amplifikates Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRV befanden. Die für die PCR genutzten Primer und DNA-Vorlagen sind in Anhang 1 dargestellt. Das PCR-Produkt wurde auf einem Gel kontrolliert, anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Das PCR-Produkt wurde dann in einen pCR2.1-Vektor ligiert, wodurch pCR2.1\_YFP entstand. Im nächsten Schritt musste eine im pcDNA3.1(+)\_ZNF423-Vektor befindliche Erkennungssequenz von EcoRV durch Mutagenese deletiert werden, da sie sich an einer ungeeigneten Position im Vektor befand. Durch diese Mutagenese entstand pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion\_EcoRV. Die EcoRV-Erkennungssequenz wurde durch Mutagenese an der Stelle in den Vektor wieder eingefügt, an der später das YFP hinein kloniert werden sollte. Hierdurch entstand der Vektor pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion+Insertion\_EcoRV. Die für die Mutagenesen verwendeten Ausgangsvektoren sowie die eingesetzten Primer sind in Anhang 3 aufgeführt. Im letzten Schritt wurden sowohl pCR2.1\_YFP als auch pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion+Insertion\_EcoRV einem Restriktionsverdau mit EcoRV unterzogen und YFP sodann in das Exon 4 von pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion+Insertion\_EcoRV hinein kloniert. Die Reaktionsansätze und -bedingungen für den Restriktionsverdau sind in Anhang 2 aufgeführt.

Der entstandene Vektor pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion+Insertion\_EcoRV+YFP wird im Folgenden als pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop bezeichnet. Im nächsten Schritt war es nötig, das Stoppcodon am Ende des YFPs zu deletieren. Diese Mutagenese wurde von Dr. Lena Harder durchgeführt und führte zu dem Vektor pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_Deletion+Insertion\_EcoRV+YFP\_stop-ex, der im Folgenden als pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex bezeichnet wird. Die hierfür verwendeten Primer sind in Anhang 3 aufgeführt.

## 4.6 Zellkultur

### 4.6.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>)-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Adhärente 293T- und U2OS-Zellen wurden in Abhängigkeit von ihrer Dichte in der Regel alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 0,05 % *Trypsin-EDTA* (*Gibco/Invitrogen*) von der Oberfläche der Zellkulturflasche oder -platte gelöst und anschließend im Verhältnis 1:10 (293T-Zellen) oder 1:5 (U2OS-Zellen) geteilt. Suspensionszellen wurden meist zwei Mal in der Woche geteilt, mit dem Ziel die ideale Dichte von 1\*10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erhalten. Hierzu wurden einmal wöchentlich die überflüssigen Zellen entfernt und das Volumen mit frischem Medium aufgefüllt. Die zweite wöchentliche Aufteilung der Zellen fand in der Regel vier Tage später statt. Hierzu wurde eine geeignete Menge Zellen für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, wobei die Zellen vor der Zählung mit Trypanblau angefärbt wurden, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können.

### 4.6.2 Medien für die Zellkultur

Tabelle 9: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur.

Kultivierte Zellen	Medium
293T/U2OS	DMEM + 10 % FCS + 1% L-Glutamin + 1 % Pyruvat + 2 % HEPES-Puffer
697/Reh 697	RPMI 1640 + 10 %FCS + 2 % L-Glutamin MethoCult™ SF H4236 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 14 % IMDM

### 4.6.3 Transfektion

Die Transfektion von 293T- und U2OS-Zellen wurde mit *Lipofectamine*<sup>®</sup> 2000 (*Invitrogen*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden am Vorabend der Transfektion pro Well  $7 \cdot 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium auf 24-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde nach einem Mediumwechsel die Transfektion durchgeführt. Sofern eine Cotransfektion mit GFP durchgeführt wurde, so wurde hierfür das GFP-Plasmid aus einem der unter 2.2 aufgeführten Kits zur *Nucleofection*<sup>®</sup> verwendet. Der Transfektionsansatz wurde für 5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Mediumwechsel.

### 4.6.4 Amaxa-Transfektion

Die Transfektion von primären Zellen und den Zelllinien 697 und Reh erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe von Kits zur *Nucleofection*<sup>®</sup>. Primäre Zellen wurden mit dem *Amaxa*<sup>™</sup> *Human CD34 Cell Nucleofactor*<sup>™</sup> *Kit* (*Lonza*) transfiziert, Zelllinien mit dem *Amaxa*<sup>™</sup> *Cell Line Nucleofactor*<sup>™</sup> *Kit R* oder *Kit V* (*Lonza*). Es wurden in der Regel pro Probe  $1 \cdot 10^6$  Zellen transfiziert und eine Cotransfektion mit dem im Kit enthaltenen GFP-Plasmid durchgeführt.

### 4.6.5 MethoCult Medium

697-Suspensionszellen wurden nach FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Sortierung zur besseren Regeneration in *MethoCult*<sup>™</sup> *SF H4236* (*STEMMCELL Technologies*) aufgenommen. Es wurden dabei die Angaben des Herstellers für CD34+ Zellen befolgt.

Die Zellen wurden später zur weiteren Verwendung aus dem Medium isoliert. Hierzu wurde das gesamte Medium in 20 ml PBS aufgenommen, 20 min bei 4 °C gelagert und anschließend zentrifugiert, mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert.

### 4.6.6 Reporterstudien

Für Reporterstudien wurden Varianten der Luciferase-Vektoren pCpGL und pGL3 verwendet, in die schon vor Beginn dieser Arbeit verschiedene Promotorsequenzen hinein kloniert worden waren. Die Reporterstudien wurden jeweils im Triplikat an 293T-Zellen durch Transfektion mit

*Lipofectamine*<sup>®</sup> 2000 (*Invitrogen*) durchgeführt. Es wurden immer drei Kontrollen mitgeführt: Als Positivkontrolle dienten die Vektoren pGL3 control und pCpGL CMV, bei denen es sich um ständig aktive Promotoren handelt, und als Negativkontrolle wurden die Leervektoren pGL3 basic und der pCpGL basic eingesetzt. Um die Transfektion zu überprüfen, wurde das Renilla-Plasmid verwendet, welches in einer Konzentration von 0,002 µg pro Reaktionsansatz eingesetzt wurde. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte am *Infinite2000* (*Tecan*). Die relative Luciferase-Aktivität wurde ermittelt, indem der Quotient aus der Luciferase- und Renilla-Aktivität gebildet wurde.

#### **4.6.7 FACS-Messung**

Durchflusszytometrische Analysen von Zellen wurden am *BD FACS Canto* mit der *FACS Diva Software* (*BD*) durchgeführt. Für die Analyse wurden 100 µl Zellen in 400 µl PBS aufgenommen und anschließend am FACS vermessen. Sollte in der Analyse zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden, wurden außerdem 5 µl *Propidiumiodid* (*BD Pharmingen*) hinzugegeben, welches die abgestorbenen Zellen anfärbt. Die Isolation einzelner Zellen aus einer Zellsuspension erfolgte am *BD FACS Aria* in der Core Facility des *Heinrich-Pette-Instituts*.

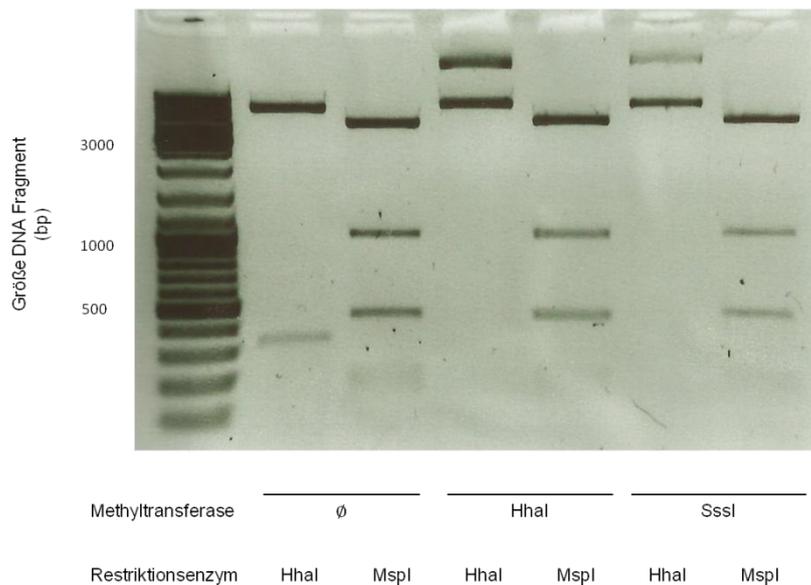
## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Methylierungsstudien der ZNF423-CpG-Insel**

Um den Einfluss der Methylierung der CpG-Insel auf die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors zu ermitteln, wurden Reporteranalysen durchgeführt. Der hierfür verwendete Vektor lag bereits zu Beginn dieser Arbeit vor. Es handelt sich um einen CpG-freien pCpGL-Luciferasevektor, in den die Sequenz des ZNF423 $\alpha$ -Promotors sowie der CpG-Insel hineinkloniert wurden. Methylierungen des Promotors und der CpG-Insel wurden mit den Methyltransferasen SssI und HhaI durchgeführt. Der Erfolg der Methylierungen wurde mit dem methylierungssensitiven Enzym HhaI sowie dem methylierungsresistenten Enzym MspI überprüft. Die DNA wurde anschließend in 293T-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität ermittelt.

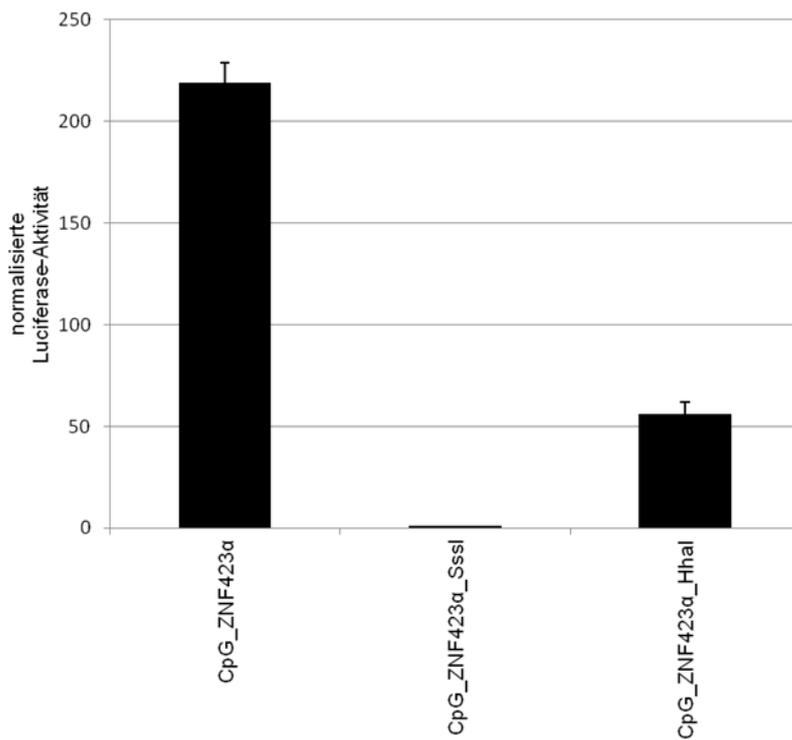
#### **5.1.1 Methylierungsstudien der CpG-Insel und des ZNF423 $\alpha$ -Promotors**

Das Konstrukt aus ZNF423 $\alpha$ -Promotor und CpG-Insel wurde der Methylierung mit oben genannten Methyltransferasen unterzogen. Die genaue Zusammensetzung der Methylierungsansätze ist in Anhang 4 und Anhang 5 beschrieben. Abbildung 5 zeigt beispielhaft eine Überprüfung der Methylierung des ZNF423 $\alpha$ -Promotors mit CpG-Insel mittels Restriktionsenzymen. Die nicht-methylierten Proben wurden sowohl von dem methylierungssensitiven HhaI als auch von dem nicht-methylierungssensitiven MspI geschnitten. Die durch die Methyltransferasen HhaI oder SssI methylierten Proben wurden nur von dem nicht-methylierungssensitiven MspI geschnitten.



**Abbildung 5: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Methylierung des ZNF423 $\alpha$ -Promotors und der CpG-Insel auf einem 1 %-igen Agarosegel. CpG\_ZNF423 $\alpha$  wurde mit der Methyltransferase Hhal oder Sssl methyliert, eine Kontrollprobe wurde nicht methyliert. Jede Probe wurde anschließend einmal mit dem Restriktionsenzymen Hhal und MspI verdaut.**

Die Aktivität der methylierten und unmethylierten Konstrukte wurde anschließend in Reporterstudien analysiert. Ein beispielhaftes Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt. Ergebnisse weiterer unabhängiger Experimente sind in Anhang 6 gezeigt. Die methylierten Konstrukte werden im Folgenden als CpG\_ZNF423 $\alpha$ \_Methyltransferase bezeichnet. Hierfür wurden je 0,2  $\mu$ g des Konstrukts pro Reaktionsansatz verwendet. In den Reporteranalysen zeigte sich, dass die DNA-Methylierung der CpG-Insel einen Einfluss auf die Promotoraktivität hat. Die Methylierung aller CpGs durch die Methyltransferase Sssl führte zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Promotoraktivität. Die Methylierung mit der Methyltransferase Hhal führte ebenfalls zu einer Unterdrückung der Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors. Die Unterdrückung der Aktivität durch die Methylierung mit Hhal fällt allerdings geringer aus als die Unterdrückung der Aktivität durch die Methylierung mit Sssl.



**Abbildung 6:** Die Methylierung der CpG-Insel und des ZNF423 $\alpha$ -Promotors beeinflusst die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors. Reportergenstudie in 293T-Zellen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

### 5.1.2 Methylierungsstudien der CpG-Insel-Mutanten

Harder et al. (2013) zeigten, dass einzelne Positionen der CpG-Insel in leukämischen Knochenmarkszellen von ALL-Patienten einen besonders niedrigen DNA-Methylierungsgrad aufweisen. Es handelt sich um die Positionen 102, 183, 220 und 250. Die Bedeutung dieser Positionen für den Einfluss der Methylierung auf die Promotoraktivität sollte genauer untersucht werden. Hierzu wurden in dem Konstrukt aus CpG-Insel und ZNF423 $\alpha$ -Promotor Mutationen an den besagten Positionen der CpG-Insel erzeugt, wobei alle Mutagenesen mittels Sequenzierung überprüft wurden. Ziel war es, für jede der Positionen zwei Mutanten zu generieren. Zum einen sollte die Position für die Methyltransferase Hhal zugänglich gemacht werden, wozu die Erkennungssequenz des Enzyms hineinmutiert wurde. Diese Mutagenese war für die Positionen 183 und 250 erfolgreich und die Mutanten sind im Folgenden als CpG-Hhal\_Position bezeichnet. Zum anderen sollte die Position für die Methyltransferase Sssl unzugänglich gemacht werden. Hierfür wurde die Erkennungssequenz des Enzyms durch einen Basenaustausch deletiert. Diese Mutagenese war für die Positionen 183, 220 und 250 erfolgreich. Außerdem konnte eine Mutante erzeugt werden, die an allen vier Positionen die Deletion trägt. Diese Mutanten werden im

Folgenden als CpG-del\_Position bezeichnet. Die für die Mutagenesen verwendeten Ausgangsvektoren und die eingesetzten Primer sind in Anhang 3 aufgeführt. Alle Mutanten wurden anschließend mit den Methyltransferasen HhaI und SssI behandelt. Die für die Methylierungen verwendeten Reaktionsansätze sind in Anhang 4 und Anhang 5 aufgeführt.

Die methylierten Mutanten werden im Folgenden mit CpG\_HhaI\_Position\_Methyltransferase bzw. CpG\_del\_Position\_Methyltransferase bezeichnet. Der Erfolg der Methylierung wurde mit oben genannten Restriktionsenzymen überprüft (Daten nicht gezeigt). Mit den methylierten Mutanten wurden Reporterstudien durchgeführt, wobei pro Reaktionsansatz je 0,2 µg der methylierten oder unmethylierten Mutanten eingesetzt wurden. Beispielhafte Ergebnisse sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Die Ergebnisse weiterer unabhängiger Experimente finden sich in Anhang 7 bis Anhang 12.

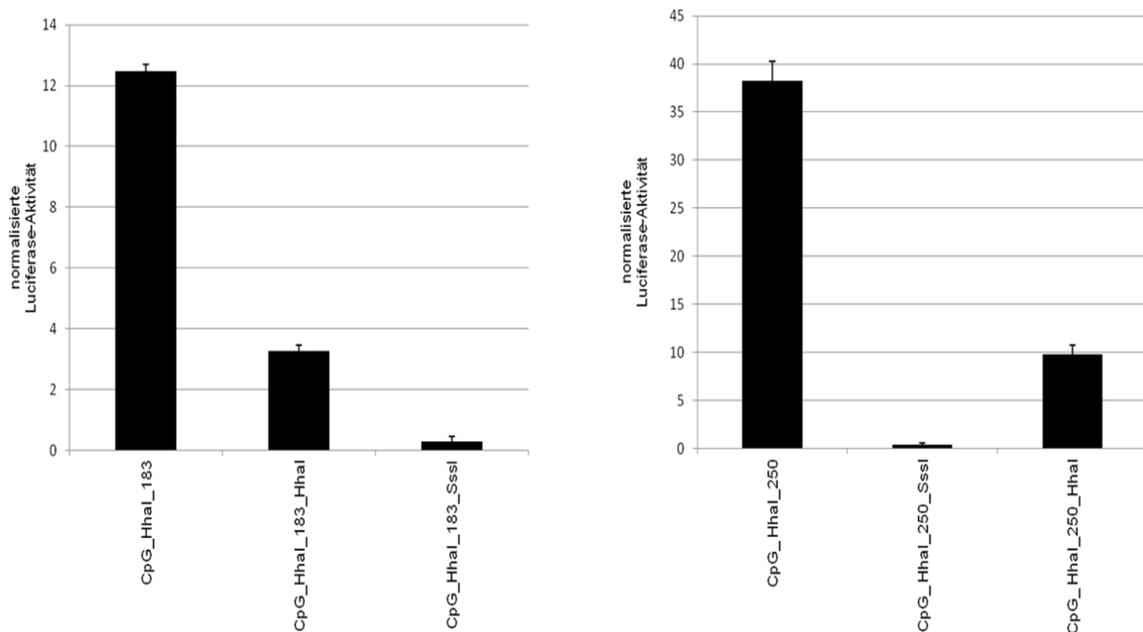


Abbildung 7: Reporterstudie in 293T-Zellen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

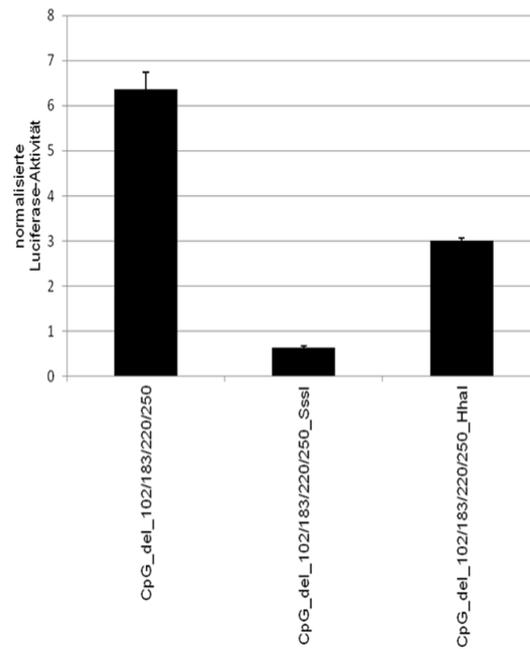
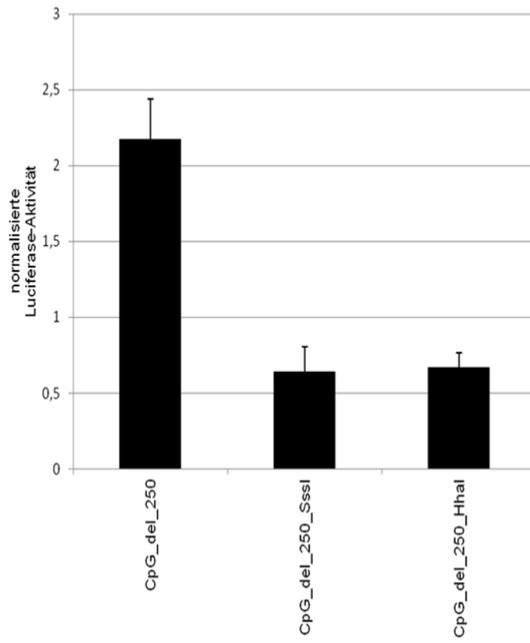
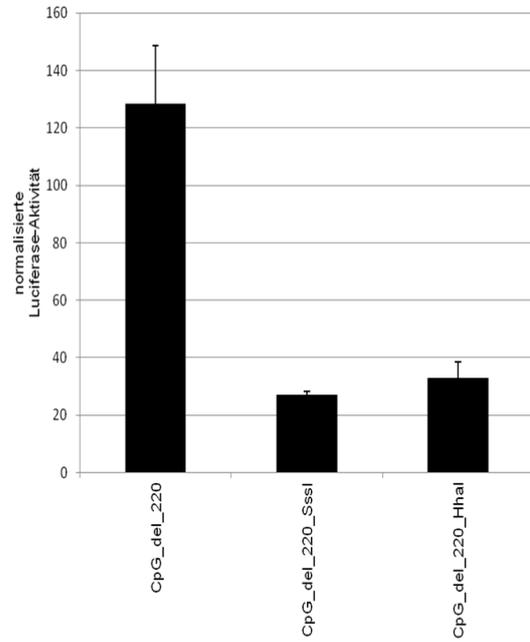
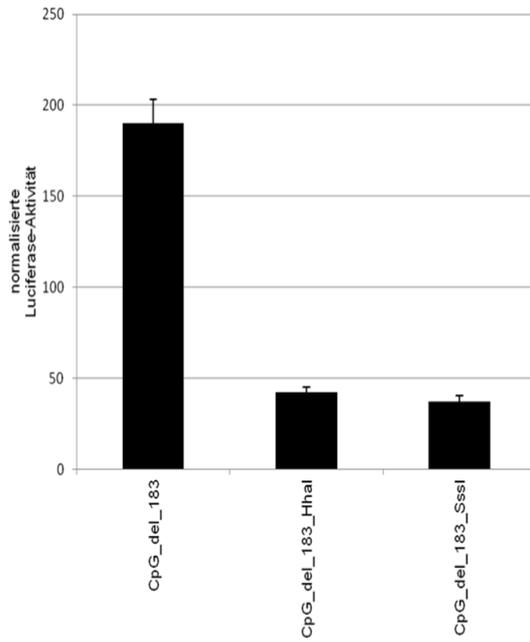


Abbildung 8: Reporterstudie in 293T-Zellen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

Die Promotoraktivitäten der Mutanten sollten mit der Promotoraktivität des Wildtyps verglichen werden. Hierzu mussten die durch Schwankungen der Transfektionseffizienz bedingten unterschiedlichen absoluten Luciferase-Aktivitäten mehrerer unabhängiger Experimente miteinander vergleichbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden für den Wildtyp und für jede Mutante die Mittelwerte der Triplikate von n=2 oder n=3 unabhängigen Experimenten gemittelt. Anschließend wurde die Aktivität des unmethylierten Promotors auf 100 % festgelegt. Das Verhältnis der methylierten Konstrukte zu den unmethylierten Gegenstücken wurde berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt.

Bei den Mutanten, in denen einzelne Positionen für die Methyltransferase Sssl unzugänglich waren, führte die Methylierung mit Sssl zu einer geringeren Abnahme der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp. Für alle drei Mutanten zeigte sich unter Methylierung mit Hhal eine geringfügig stärkere Unterdrückung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante, in der alle Positionen für Sssl unzugänglich waren, wies im Vergleich mit den Einzelmutanten eine geringere Abnahme der Promotoraktivität sowohl unter Methylierung mit Hhal als auch unter Methylierung mit Sssl auf.

Für die Mutanten, in denen die fraglichen Positionen für die Methyltransferase Hhal zugänglich waren, zeigte sich unter Methylierung mit Hhal nur ein geringfügiger Unterschied der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp.

Die Aktivität der Mutanten nahm unter Methylierung mit Hhal etwas stärker ab als die Aktivität des Wildtyps bei gleicher Methylierung. Unter Methylierung mit Sssl blieb die Aktivität des Promotors im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

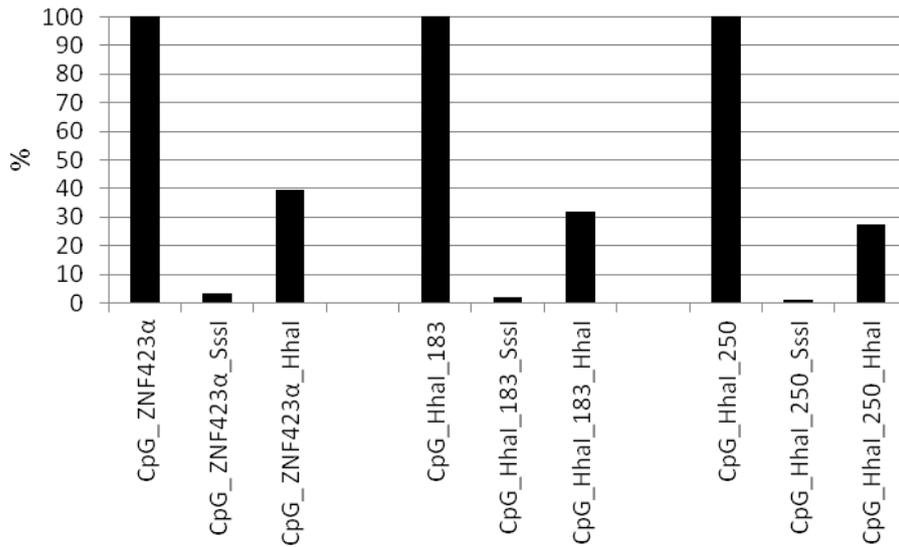


Abbildung 9: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 7. Vergleich der Promotoraktivitäten der Mutanten mit der Promotoraktivität des Wildtyps. Die Mittelwerte der Triplikate von n=3 (CpG\_Hhal\_183) bzw. n=2 (CpG\_Hhal\_250) unabhängigen Experimenten wurden gemittelt. Aktivität des unmethylierten Promotors= 100 %.

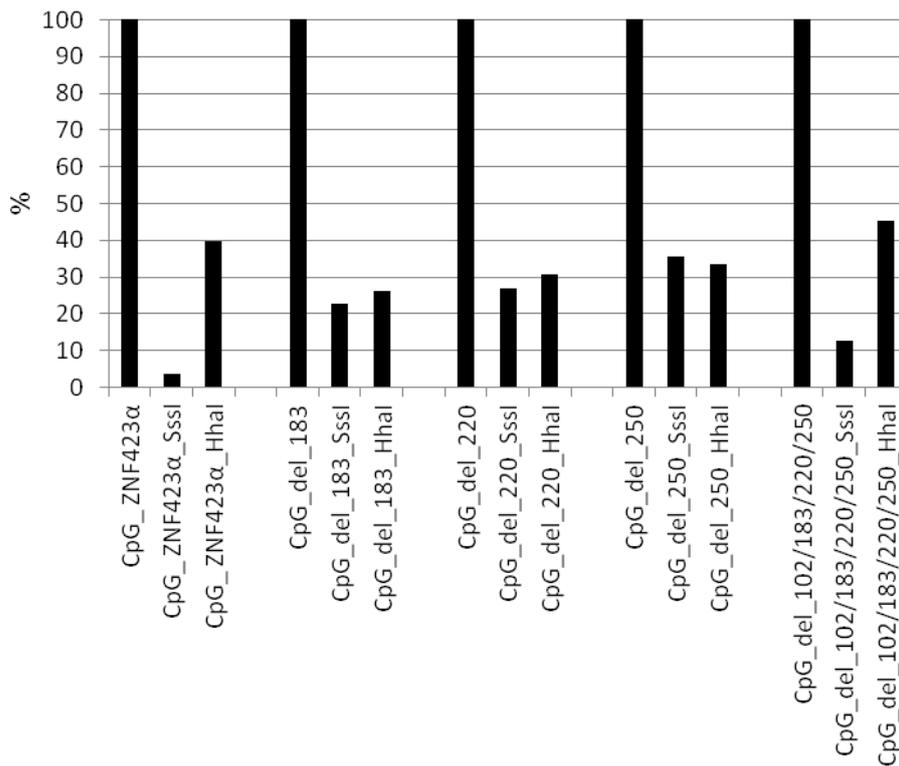


Abbildung 10: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 8. Vergleich der Promotoraktivitäten der Mutanten mit der Promotoraktivität des Wildtyps. Die Mittelwerte der Triplikate von n=3 unabhängigen Experimenten wurden gemittelt. Für die Mutante CpG\_del\_102/183/220/250 gilt n=2. Aktivität des unmethylierten Promotors= 100 %.

## 5.2 TALEN

### 5.2.1 Bestimmung der Schnittstelle der TALENs

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde die Stelle im ZNF423-Gen bestimmt, an der die TALENs binden sollten. Exon 4 wurde als Zielregion ausgewählt, da die beiden Isoformen ZNF423 $\alpha$  und  $-\beta$  erst ab Exon 3 identisch sind. Exon 3 ist jedoch zu kurz, um als Ansatzpunkt für die TALENs in Betracht zu kommen, so dass Exon 4 als Bindungsstelle für die TALENs ausgewählt wurde. ZNF423-Exon 4 wurde daraufhin von der Herstellerfirma mit der *TALEN™ Hit™ Software* einem sogenannten „*TALEN Hit Search*“ unterzogen. Hierbei wurden die am besten geeigneten Bindungsstellen für die TALENs in ZNF423-Exon 4 ermittelt. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des „*TALEN Hit Search*“.



Abbildung 11: Ergebnis des von der Herstellerfirma durchgeführten „Hit Search Reports“. Im oberen Bereich der Abbildung ist ein Ausschnitt aus der Sequenz von ZNF423-Exon 4 gezeigt. Die grauen Balken zeigen die möglichen Bindungsstellen von TALENs innerhalb von ZNF423-Exon 4. Der gelbe Balken zeigt die laut *TALEN™ Hit™ Software* am besten geeignete Bindungsstelle für TALENs für dieses Projekt.

### 5.2.2 Überprüfung von ZNF423-Exon 4 auf Einzelnukleotid-Polymorphismen

Schon vor Beginn dieser Arbeit wurde der Bereich, der als Bindungsstelle für die TALENs avisiert wurde - ZNF423-Exon 4 -, auf mögliche Einzelnukleotid-polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) geprüft. Bei einer Analyse der Datenbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) stellte sich heraus, dass sich im Exon 4 ein möglicher SNP befindet. Um herauszufinden, ob die für diese Arbeit interessante Zelllinie 697 diesen SNP trägt, wurde das 4. Exon mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert, wobei sich zeigte, dass ein PCR-Produkt der erwarteten Größe entstanden war. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass die Zelllinie 697 den in der Datenbank geführten SNP nicht trägt.

### 5.2.3 Amaxa-Transfektionsratenmessung

Bei den für diese Arbeit und zukünftig geplante Experimente interessanten Zelllinie 697 und die primäre Leukämie 8353 handelt es sich um Zellen, die mit üblichen, lipidbasierten Transfektionsmethoden gar nicht oder nur mit sehr geringer Effizienz transfiziert werden können, wie sich bei früheren Arbeiten im Institut gezeigt hatte. Für die Transfektion dieser Zellen hatte sich bei vorherigen Arbeiten die Methode der *Nucleofection*® als geeignet herausgestellt. Für die Zelllinien und die primäre Leukämie musste das effizienteste Transfektionsprotokoll gefunden werden. Hierfür wurden vom Hersteller vorgeschlagene, unterschiedliche Protokolle an den Zellen getestet, indem je 1 µg des im Kit mitgelieferten GFP-Plasmids transfiziert wurde. Die Zellen der primären Leukämie 8353 und die 697-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion am FACS vermessen. Für die primäre Leukämie wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt. Für die Zelllinie 697 wurde sowohl der Anteil der lebenden Zellen als auch der Anteil der GFP-positiven Zellen an der lebenden Population bestimmt.

Abbildung 12 zeigt die Transfektionseffizienz der an 8353-Zellen getesteten Transfektionsprotokolle.



**Abbildung 12: Primäre Leukämie 8353. Anteil der GFP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation in Abhängigkeit vom verwendeten Amaxa-Transfektionsprotokoll.**

Abbildung 13 zeigt den Anteil GFP-positiver 697-Zellen in Abhängigkeit von den getesteten Transfektionsprotokollen. Auf Grund des besten Verhältnisses zwischen der Anzahl der lebenden Zellen, welche mittels Propidiumiodid von den toten Zellen unterschieden wurden, und der Transfektionsrate wurde in dieser Arbeit mit dem Transfektionsprotokoll T-016 weitergearbeitet.



Abbildung 13: 697-Zellen, Anteil der lebenden Zellen und Anteil der GFP-positiven Zellen an den lebenden Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Amaxa Transfektionsprotokoll.

#### 5.2.4 Klonierung der „Matrix“ (Reparaturvorlage Homologe Rekombination)

Der nach einem TALEN-induzierten DBS einsetzende Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination ermöglicht die Modifikation des Zielgens, sofern eine geeignete Reparaturvorlage („Matrix“) vorliegt. Die Matrix, die in mehreren Klonierungsschritten generiert wurde, besteht aus drei Abschnitten: „upstream“, „YFP“ und „downstream“. Up- und downstream entsprechen homologen Regionen des Zielgens. Die Sequenz von upstream ist identisch mit der Sequenz, die 5' an die Bindungsstelle der TALENs im ZNF423-Gen grenzt. Die Sequenz von downstream ist identisch mit der Sequenz, die 3' an die Bindungsstelle der TALENs grenzt. Zwischen upstream und downstream liegt ein YFP-Reporter, bei dem es sich um das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*) handelt. YFP ist der Teil der Matrix, der im Rahmen der Homologen Rekombination in das Genom der Zelle integriert werden soll. Das YFP trägt am Ende seiner Sequenz ein Stoppcodon, welches nach erfolgreicher Integration in ZNF423-Exon 4 zu einem Abbruch der Transkription an dieser Stelle führt und somit einen Funktionsverlust von ZNF423 bewirkt. Auf Grund der fluoreszierenden Eigenschaften des YFPs können erfolgreich modifizierte Zellen später im FACS identifiziert und aus der Gesamtpopulation isoliert werden. In Abbildung 14 ist der schematische Aufbau der Matrix dargestellt. Die einzelnen Fragmente der Matrix wurden in einen pCR2.1-Vektor kloniert. Der pCR2.1-Vektor ermöglicht die Expression des YFP nach dessen Integration in das Genom der Zielzelle.

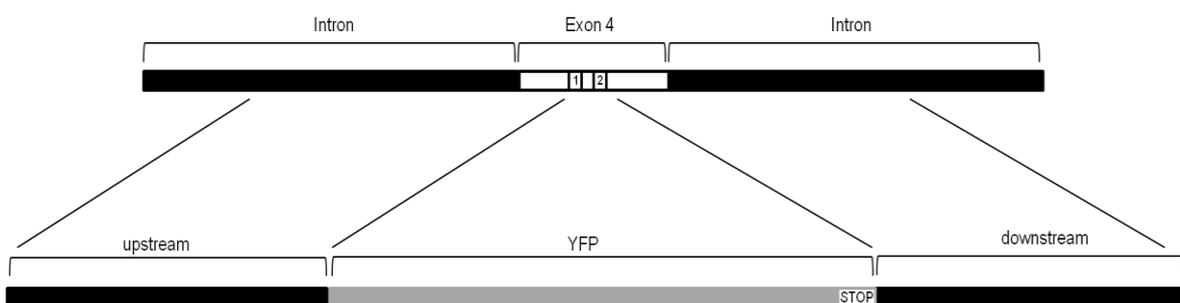
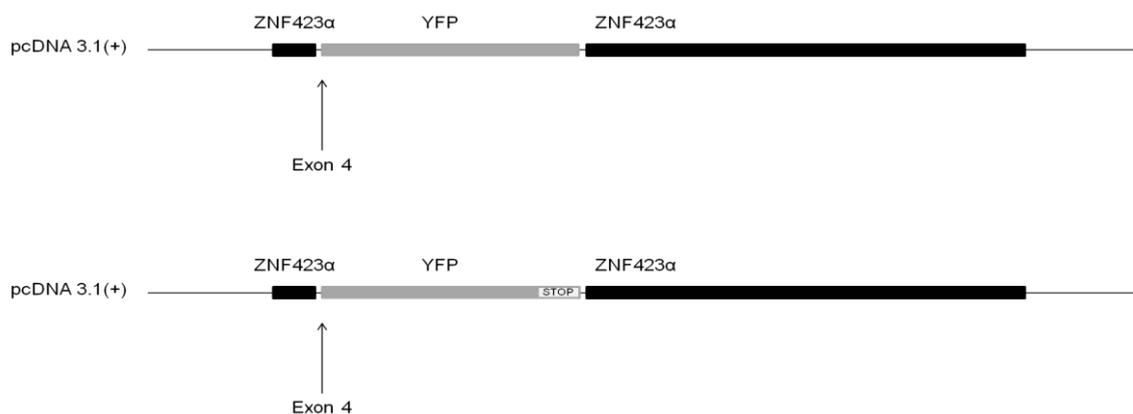


Abbildung 14: Schematische Darstellung von ZNF423-Exon 4 mit angrenzenden Introns (oben) und pCR2.1\_Matrix (unten). Im oberen Bereich der Abbildung ist das Exon 4 von ZNF423 mit den angrenzenden Introns dargestellt. Bei den mit 1 und 2 markierten Bereichen handelt es sich um die Bindungsstellen der TALENs (1=Bindungsstelle TALEN links, 2= Bindungsstelle TALEN rechts). Im unteren Bereich der Abbildung ist das im pCR2.1-Vektor befindliche Konstrukt der Matrix dargestellt. Die 431 bp lange Sequenz von upstream stimmt mit der Sequenz überein die stromaufwärts an die Bindungsstelle von TALEN links grenzt. Die 413 bp lange Sequenz von downstream ist identisch mit der Sequenz, die stromabwärts an die Bindungsstelle von TALEN rechts grenzt. Zwischen upstream und downstream befindet sich ein gelb fluoreszierendes Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP). YFP trägt ein Stoppcodon am Ende seiner Sequenz.

## 5.2.5 Klonierung der Kontrollvektoren pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex

Für die Experimente, in denen YFP nach TALEN-induziertem DSB und folgender Homologer Rekombination in das ZNF423-Exon 4 integriert werden sollte, mussten vor Beginn der eigentlichen Arbeit drei Bedingungen geklärt werden. Zum einen musste gezeigt werden, dass das in das Genom integrierte YFP zu einem funktionsfähigen und somit im FACS detektierbaren Protein führt. Zum anderen musste der Beweis erbracht werden, dass nach erfolgreicher Integration von YFP in das Exon 4 kein funktionsfähiges ZNF423-Protein mehr gebildet werden kann und somit durch diesen Versuchsaufbau ein Knock-out von ZNF423 erzielt wird. Außerdem war es erforderlich zu zeigen, dass nicht allein die Integration von YFP in das Genom der Zelle zu einem Funktionsverlust von ZNF423 führt. Dass also die Integration der YFP-Sequenz ohne terminales Stoppcodon keinen Effekt auf die Funktionsfähigkeit von ZNF423 hat. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor entwickelt, in dem die reale Situation eines in ZNF423-Exon 4 integrierten YFPs nachgestellt wurde. Als Basis für diesen Vektor wurde der pcDNA3.1(+)\_ZNF423-Vektor gewählt. In diesen Vektor wurde ein YFP mit terminalem Stoppcodon an exakt der Stelle in die ZNF423-Sequenz hinein kloniert, an der es sich in Zellen nach erfolgreicher Integration befinden würde. Der hierdurch entstandene Vektor pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop konnte zur Beantwortung der ersten beiden oben genannten Fragestellungen genutzt werden. Die dritte Fragestellung wurde mit Hilfe des Vektors pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex bearbeitet, welcher sich von pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop nur dadurch unterscheidet, dass ein Stoppcodon am Ende der YFP-Sequenz deletiert wurde.

Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung beider Kontrollvektoren.



**Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Vektoren pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex (oben) und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop (unten).**

## 5.2.6 FACS-Analyse des Vektors pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop zur Überprüfung der Fluoreszenz des integrierten YFPs

Um zu ermitteln, ob ein ins Genom integriertes YFP weiterhin zu einem funktionsfähigen Protein führt, wurden 293T-Zellen mit 0,2 µg bzw. 0,4 µg Plasmid pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop transfiziert und zwei Tage später am FACS auf YFP-positive Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass ein Teil der mit dem Vektor transfizierten Zellen im FACS fluoreszierte. Abbildung 16 zeigt die FACS Daten.

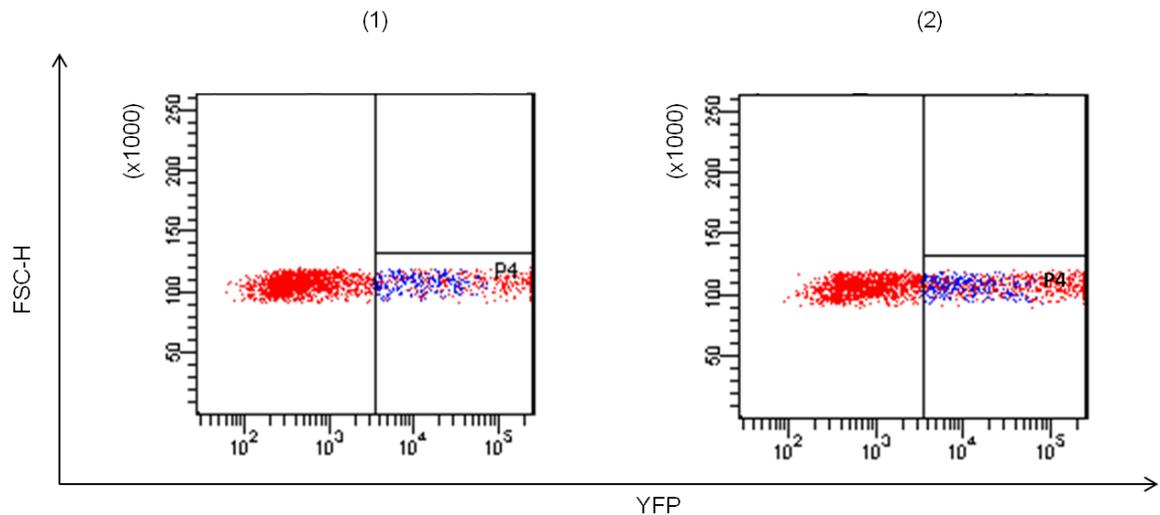


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse von 293T-Zellen. Transfiziert wurden:

(1) 0,2 µg pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop

(2) 0,4 µg pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop.

Alle in die Analyse eingeschlossenen Zellen sind in rot dargestellt. Die im mit „P4“ bezeichneten Gate befindlichen YFP-positiven Zellen sind in blau dargestellt.

### 5.2.7 Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop exprimierten ZNF423-Proteins

Mit Hilfe eines Luciferase Assays wurde überprüft, ob die Integration von YFP in das vierte Exon von ZNF423 wie erwartet zu einem Funktionsverlust des ZNF423-Proteins führt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden pGL3\_CD79b, pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop transfiziert, wobei pcDNA3.1(+) dazu diente, in allen Proben die Menge an transfiziertem Plasmid anzugleichen. Das Pipettierschema findet sich in Anhang 13. ZNF423 unterdrückt normalerweise die Aktivität von CD79b durch Sequestration von EBF1. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des Luciferase Assays. Es zeigte sich, dass pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop im Gegensatz zu pcDNA3.1(+)\_ZNF423 die Aktivität von CD79b nicht signifikant unterdrückt.

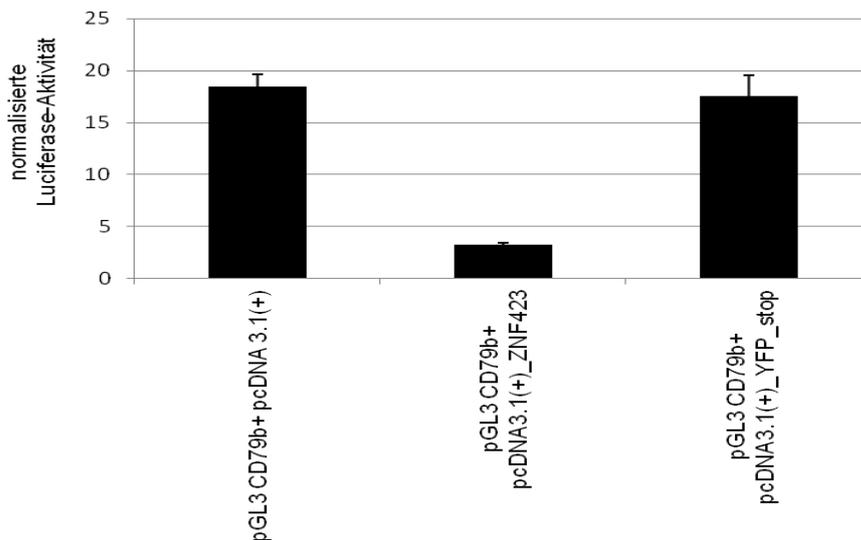


Abbildung 17: Überprüfung des Einflusses von pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop auf die Aktivität von pGL3\_CD79b. Als Ausgleich der transfizierten Plasmidmenge dient der Vektor pcDNA3.1(+). Reporterstudie in 293T-Zellen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

## 5.2.8 Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex exprimierten ZNF423-Proteins

Ein weiterer Luciferase Assay wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Vektor pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex zu einer Expressierung von funktionsfähigem ZNF423 führt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden pGL3 CD79b, pcDNA3.1(+)\_EBF, pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex transfiziert. pcDNA3.1(+)\_EBF dient hierbei als Verstärker der Aktivität von pGL3 CD79b. Der Vektor pcDNA3.1(+) wurde genutzt, um in allen Proben die gleiche Menge DNA zu erhalten. Das Pipettierschema findet sich in Anhang 14 und die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Es zeigte sich, dass pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex die Aktivität von pGL3 CD79b ebenso stark unterdrückt wie pcDNA3.1(+)\_ZNF423, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass aus dem Vektor pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex funktionsfähiges ZNF423 exprimiert wird. Der erwartete Verstärkungseffekt von pcDNA3.1(+)\_EBF auf die Aktivität von CD79b zeigte sich nicht, wurde aber in weiteren unabhängigen Experimenten, die von Dr. Harder nach Beendigung dieser Arbeit durchgeführt wurden, gezeigt.

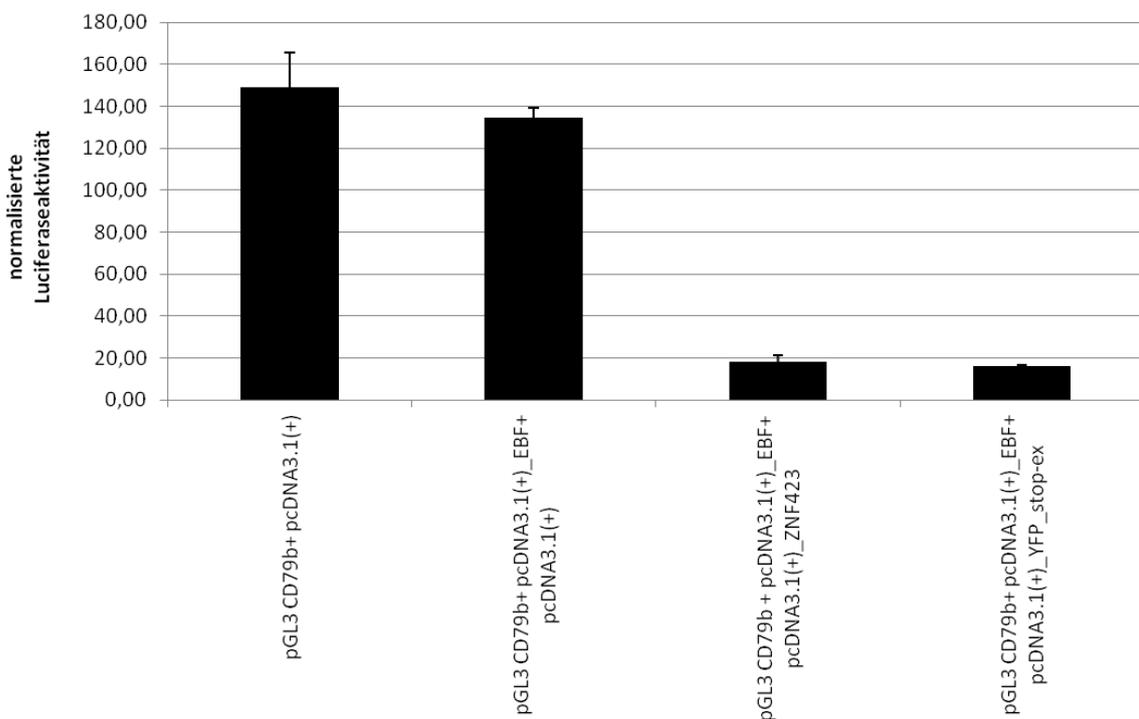


Abbildung 18: Überprüfung des Einflusses von pcDNA3.1(+)\_EBF, pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex auf die Aktivität von pGL3 CD79b. Als Ausgleich der transfizierten Plasmidmenge dient der Vektor pcDNA3.1(+). Reporterstudie in 293T-Zellen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

### 5.2.9 Testung des Knock-outs in 293T-Zellen

Um in späteren Experimenten mit der für diese Arbeit interessanten Zelllinie 697 einen effizienten Knock-out von ZNF423 durch den Einsatz der TALENs zu erzielen, sollte deren Effizienz zunächst in 293T-Zellen getestet werden. Hierzu wurden 293T-Zellen mit verschiedenen Mengen der TALENs transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem pcDNA3.1(+) Vektor transfiziert wurden. Für alle Zellen wurde eine Cotransfektion mit GFP durchgeführt. Die Reaktionsansätze für die Transfektion sind in Anhang 15 aufgeführt. Drei Tage nach Transfektion wurden die GFP-positiven Zellen am FACS aus der Gesamtpopulation isoliert. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. In einer real time PCR konnte dann die ZNF423-mRNA Menge quantifiziert werden. Abbildung 19 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis der real time PCR. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Knock-out von ZNF423 erreicht wurde. Einzig die Probe, in der 0,5µg/TALEN transfiziert wurden, zeigte eine signifikante, wenn auch nur leichte Reduktion der relativen ZNF423-Expression. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der transfizierten Menge TALEN und der Effizienz des Knock-outs gefunden werden.

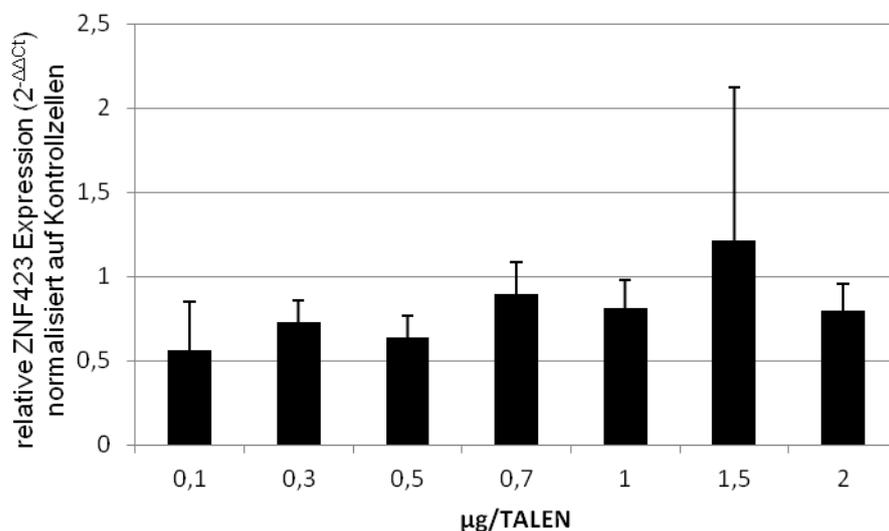
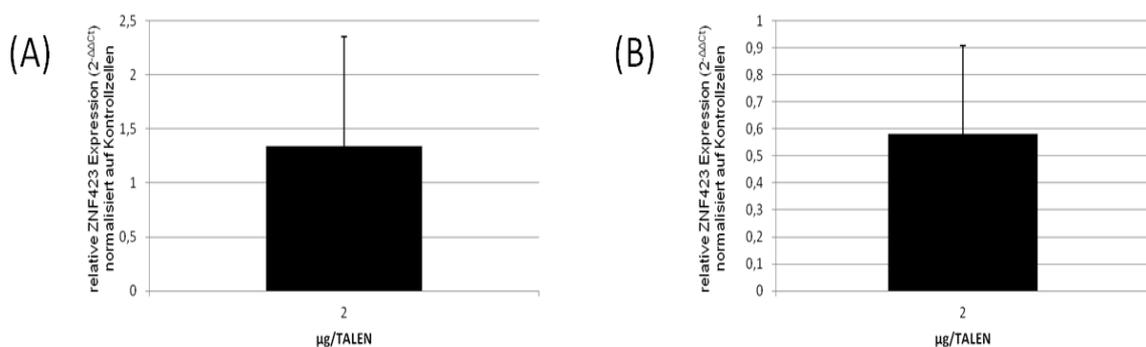


Abbildung 19: Relative Expression von Expression von ZNF423 in Abhängigkeit von der transfizierten Menge TALEN. Transfektion von 293T-Zellen mit unterschiedlichen Mengen TALEN und anschließende Quantifizierung der mRNA Menge von ZNF423 mittels real time PCR. Die Balken zeigen die Mittelwerte der relativen ZNF423-Expression (2-ΔΔCt) ±Standardabweichung. Als Referenz-Gen wurde β2M verwendet.

### 5.2.10 Testung des Knock-outs in 697-Zellen

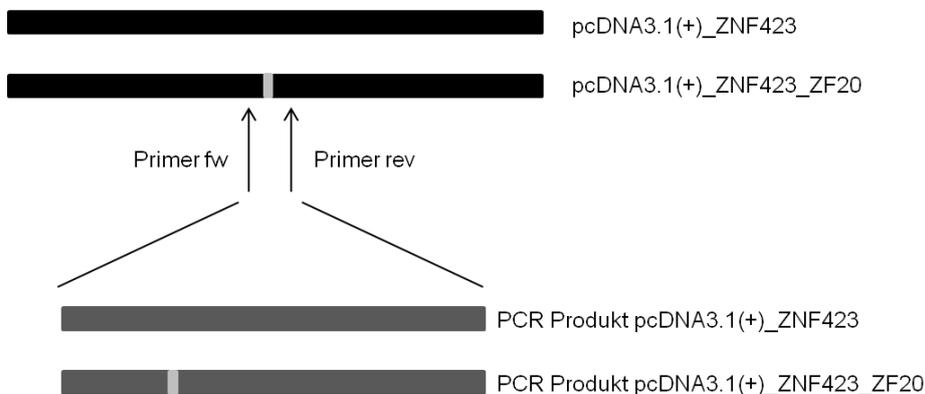
Trotz des nicht wie erwartet eingetretenen ZNF423-Knock-outs durch TALENs in 293T-Zellen sollte die Effizienz des Knock-outs auch in 697-Zellen geprüft werden, da es sich hierbei um die für diese Arbeit aussagekräftigsten Zellen handelt. Die 697-Zellen wurden hierzu mit TALENs transfiziert. Als Kontrolle dienten entweder Zellen, die mit einem pcDNA3.1(+)-Vektor oder nur einem der beiden TALENs (TALEN links) transfiziert wurden. Eine Cotransfektion von GFP ermöglichte die Isolation der GFP-positiven Zellen am FACS. Anhang 16 zeigt die Zusammensetzung der Transfektionsansätze. Aus den sortierten Zellen wurde RNA isoliert und dann in cDNA umgeschrieben. Aus den für die qPCR in Abbildung 20a verwendeten Zellen wurden einen Tag nach Transfektion die GFP-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation isoliert. Die Zellen wurden daraufhin für 5 Tage wieder in Kultur genommen und dann für die RNA-Isolation lysiert. Aus den für die qPCR in Abbildung 20b verwendeten Zellen wurden 8 Tage nach Transfektion die GFP-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation isoliert und diese Zellen sofort für die RNA-Isolation lysiert. Die ZNF423-mRNA konnte mittels real time PCR bestimmt werden. Abbildung 20a und Abbildung 20b zeigen die Ergebnisse der real time PCRs. Es konnte in keinem der beiden Experimente eine signifikante Reduktion der relativen ZNF423-Expression erzielt werden. Anzumerken ist an dieser Stelle auch die große Standardabweichung in beiden Experimenten, die eine Auswertung unmöglich macht.



**Abbildung 20: Relative ZNF423-Expression in 697-Zellen nach TALEN-Transfektion. (A)** Aus allen transfizierten Zellen wurde nach einem Tag die GFP-positive Population isoliert. Die sortierten Zellen wurden für 5 Tage in Kultur genommen und dann für RNA-Isolation lysiert. **(B)** Aus allen transfizierten Zellen wurde 8 Tage nach Transfektion die GFP-positive Population isoliert und noch am selben Tag für RNA-Isolation lysiert. **(A+B)** Anschließende Quantifizierung der ZNF423-mRNA per real time PCR. Die Balken zeigen die Mittelwerte der relativen ZNF423-Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )  $\pm$  Standardabweichung. Als Referenz-Gen diente  $\beta 2M$ .

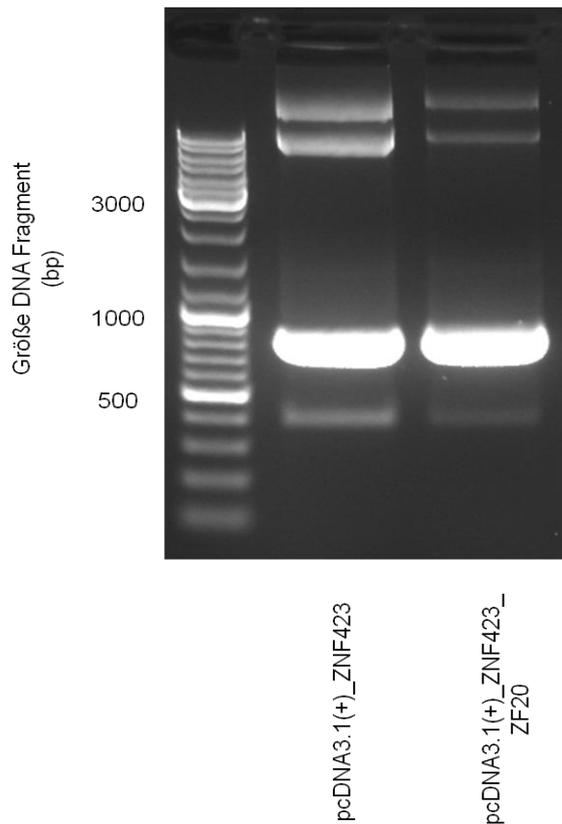
### 5.2.11 CEL-1 Assay

Der von den TALENs zu erwartende ZNF423-Knock-out sollte nicht nur auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden, sondern es sollte auch eine Veränderung auf genomischer Ebene gezeigt werden können. Hierzu wurde ein CEL-1 Assay mit *Surveyor Nuklease* eingesetzt. Im ersten Schritt wurde der Assay mit den im Kit vorgesehenen Kontrollreaktionen durchgeführt. Nach mehreren fehlgeschlagenen Versuchen (Daten nicht gezeigt), in denen die am Anfang des Assays stehende PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt worden war, wurde für diese PCR in folgenden Versuchen das *Expand High Fidelity* System mit einer *proof-reading* Polymerase verwendet. Die Ergebnisse der Kontrollreaktion entsprachen daraufhin den Erwartungen (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde der Assay mit zwei Plasmiden durchgeführt, die sich nur durch eine Punktmutation unterscheiden: pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20. Der relevante DNA-Abschnitt wurde zunächst mittels PCR amplifiziert. Die Lage der PCR-Primer „HEK CEL-1 fw“ und „HEK CEL-1 rev“ um die Punktmutation sowie die entstehenden PCR-Produkte sind in Abbildung 21 gezeigt.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der Lage der PCR-Primer um den relevanten DNA-Abschnitt der Vektoren pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 sowie der entstehenden PCR-Produkte. Das hellgraue Kästchen zeigt jeweils die Position, an der sich die Vektoren pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 durch eine Punktmutation unterscheiden.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft, welches in Abbildung 22 gezeigt ist. Es entstand ein PCR-Produkt von ca. 800 bp, das mit der erwarteten Größe von 792 bp vereinbar ist. Neben dem gewünschten PCR-Produkt entstand jedoch auch noch ein weiteres PCR-Nebenprodukt mit einer Größe von ca. 400 bp. Durch Ausschneiden der Bande mit der erwarteten Länge von ca. 800 bp aus dem Gel wurde gewährleistet, dass nur mit dem korrekten PCR-Produkt weitergearbeitet wurde.

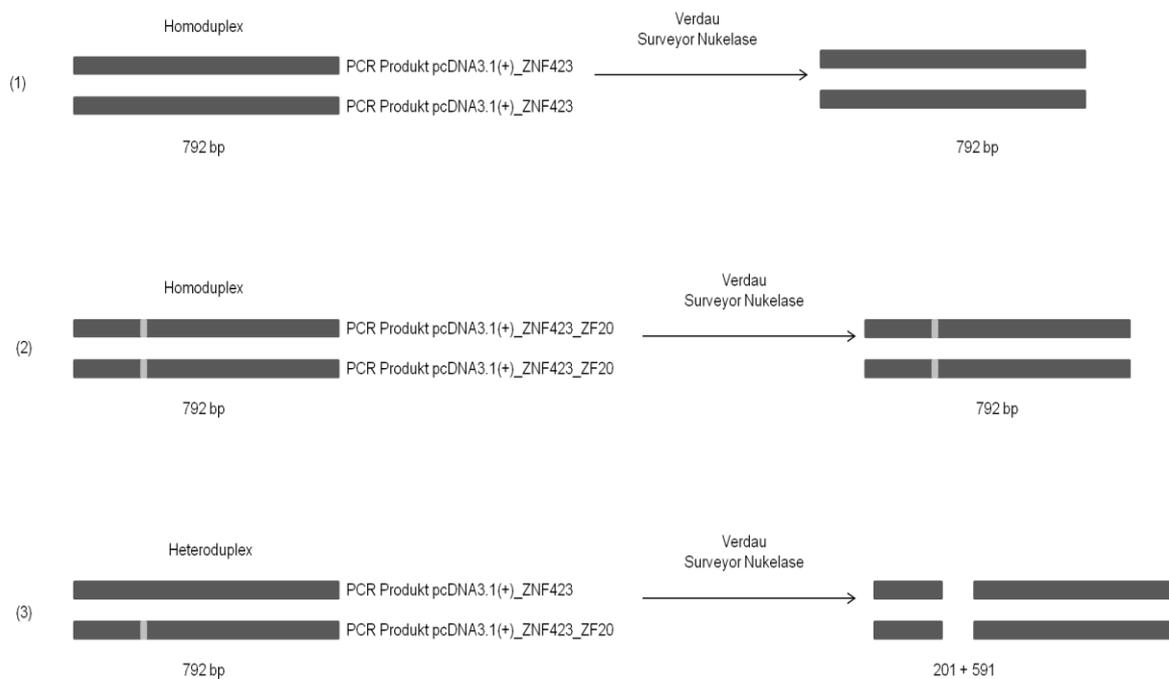


**Abbildung 22:** Überprüfung des PCR-Produktes auf einem Agarosegel. Für die PCR-Ansätze pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 zeigen sich jeweils zwei Banden unterschiedlicher Größe und unterschiedlicher Intensitäten bei ca. 800 bp und 400 bp.

Anschließend wurden drei Hybridisierungsansätze erstellt:

- 1) 300 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423
- 2) 300 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 und
- 3) 150 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423 + 150 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden alle Ansätze für 60 min mit *Surveyor Nuklease* verdaut. Abbildung 23 zeigt schematisch die erwarteten DNA-Fragmente nach dem Verdau mit *Surveyor Nuklease*.



**Abbildung 23:** Übersicht über die zu erwartenden DNA-Fragmente nach Verdau der Hybridisierungsansätze mit *Surveyor Nuklease*. Für Homoduplexe aus (1) pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und (2) pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 ist nach dem Verdau ein DNA-Fragment von 792 bp zu erwarten. Im Falle einer Formation von Heteroduplexen (3) aus pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 sind nach dem Verdau Fragmente von 201 bp und 591 bp zu erwarten.

Der Verdau wurde anschließend auf einem 2 %-igen Agarosegel analysiert und ist in Abbildung 24 gezeigt. Für die Hybridisierungsansätze 1 und 2 zeigte sich jeweils eine Bande mit einer Größe von ca. 800 bp. Dieses Ergebnis passt zur erwarteten Bande von 792 bp und zeigt, dass die Homoduplexe aus pcDNA3.1(+)\_ZNF423 oder pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 von der *Surveyor Nuklease* nicht geschnitten wurden. Für Hybridisierungsansatz 3 zeigten sich drei Banden mit einer Größe von ca. 800 bp, 600 bp und 200 bp. Die drei Banden deuten darauf hin, dass sich nach der Hybridisierung sowohl Homoduplexe aus pcDNA3.1(+)\_ZNF423 oder pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 als auch Heteroduplexe aus pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 gebildet haben. Die Homoduplexe wurden von der *Surveyor Nuklease* nicht geschnitten, wodurch die Bande von ca. 800 bp erklärt werden kann. Die entstandenen Heteroduplexe wurden von der *Surveyor Nuklease* am Ort der zwischen den beiden PCR-Produkten nicht übereinstimmenden Punktmutation geschnitten, wodurch die Fragmente von 201 und 591 bp entstanden.

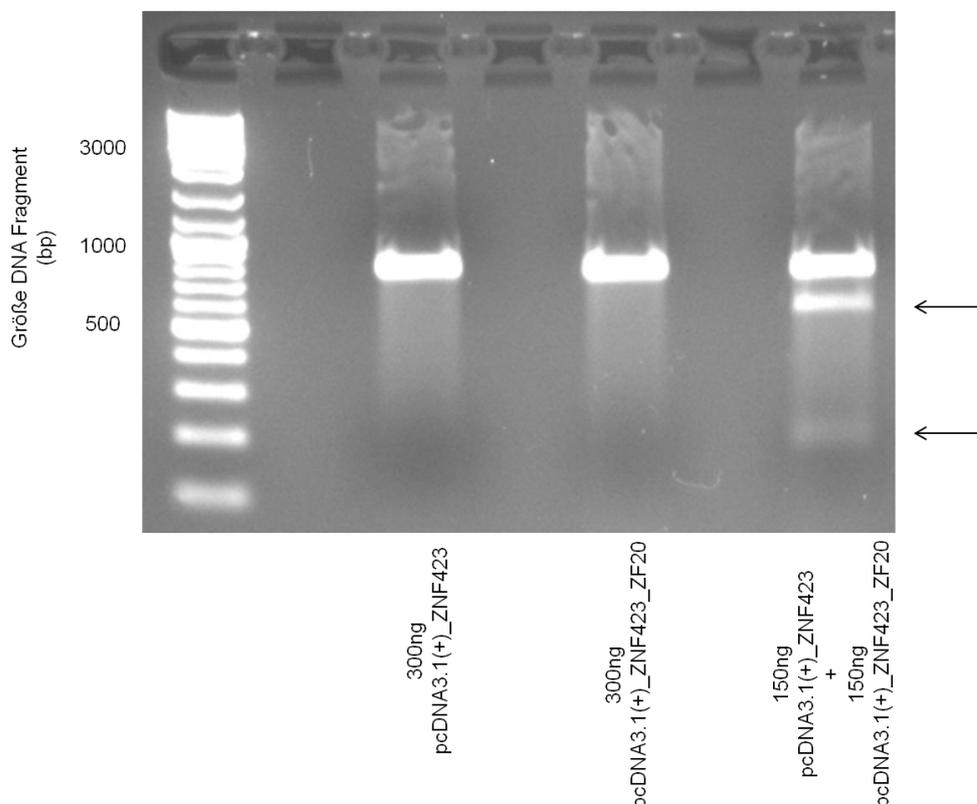
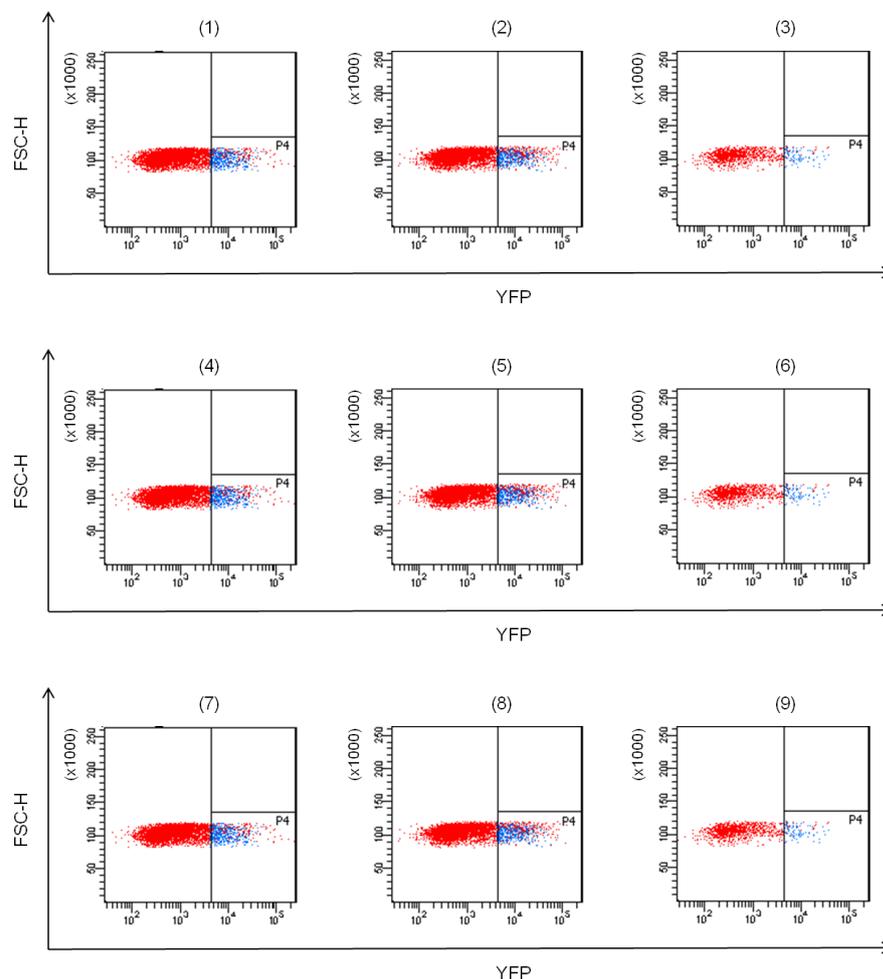


Abbildung 24: Analyse des Verdau der Hybridisierungsansätze mit *Surveyor Nuklease*. Für den Hybridisierungsansatz aus 300 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423 sowie für den Hybridisierungsansatz aus 300 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 entstand jeweils eine Bande von ca. 800 bp. Für den Hybridisierungsansatz aus 150 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und 150 ng pcDNA3.1(+)\_ZNF423\_ZF20 entstanden Banden von ca. 800 bp, 600 bp und 200 bp. Die Pfeile markieren die Schnittprodukte, die durch den Verdau von Heteroduplexen mit *Surveyor Nuklease* entstanden sind.

## 5.2.12 Testung der ZNF423-Modifikation (YFP\_stop Integration) in 293T-Zellen

Die Integration von YFP in das vierte Exon von ZNF423 durch Homologe Rekombination mit einer geeigneten Reparaturvorlage („Matrix“) sollte zunächst in 293T-Zellen etabliert werden. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen von pCR2.1\_Matrix und TALENs in 293T-Zellen transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze ist in Anhang 17 aufgelistet. Zwei Tage nach Transfektion wurde der Anteil der YFP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation am FACS ermittelt. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse.



**Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse von 293T-Zellen. Transfiziert wurden:**

- (1) 1 µg TALEN links+1 µg TALEN rechts+1 µg pCR2.1\_Matrix
- (2) 1 µg TALEN links+1 µg TALEN rechts+2 µg pCR2.1\_Matrix
- (3) 1 µg TALEN links+1 µg TALEN rechts+3 µg pCR2.1\_Matrix
- (4) 1,5 µg TALEN links+1,5 µg TALEN rechts+0,75 µg pCR2.1\_Matrix
- (5) 1,5 µg TALEN links+1,5 µg TALEN rechts+1,5 µg pCR2.1\_Matrix
- (6) 1,5 µg TALEN links+1,5 µg TALEN rechts+3 µg pCR2.1\_Matrix
- (7) 1,5 µg TALEN links+1,5 µg TALEN rechts+4,5 µg pCR2.1\_Matrix
- (8) 2 µg TALEN links+2 µg TALEN rechts+2 µg pCR2.1\_Matrix
- (9) 2 µg TALEN links+2 µg TALEN rechts+3 µg pCR2.1\_Matrix.

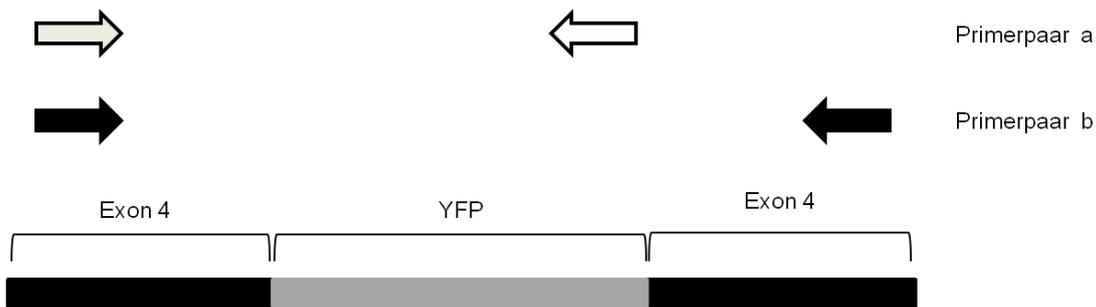
In rot dargestellt sind alle in die Analyse eingeschlossenen Zellen. Im mit „P4“ bezeichneten Gate sind die YFP-positiven Zellen in blau abgebildet.

In Tabelle 10 sind die prozentualen Anteile der YFP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation aufgeführt. Die Daten zeigen, dass ein Teil der untersuchten Population YFP-positiv ist.

**Tabelle 10: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analyse der 293T-Zellen aus Abbildung 25. Anteil der YFP-positiven Zellen an allen in die Analyse eingeschlossenen Zellen.**

Probe (Bezeichnung s. Abbildung 25)	Anteil YFP-positiver Zellen (%) an der gegateten Population
(1)	10,9
(2)	12,4
(3)	8,5
(4)	5,7
(5)	4,7
(6)	8,2
(7)	9,5
(8)	9,5
(9)	5,2

Bei Zellen, die sich im FACS als YFP-positiv darstellen, ist davon auszugehen, dass in diesen Zellen die Integration von YFP ins Genom erfolgt ist. Um die Integration des YFPs ins Genom auch auf genomischer Ebene nachweisen zu können, wurde eine Genotypisierungs-PCR verwendet. Abbildung 26 zeigt schematisch das Funktionsprinzip der Genotypisierungs-PCR. Es wurden hierfür zwei Primerpaare erstellt. Das erste Primerpaar (a) bindet mit dem „vorwärts“-Primer außerhalb des Bereiches, in dem YFP integriert werden soll. Der „rückwärts“-Primer bindet im Randbereich der Sequenz des YFPs. So ist für dieses Primerpaar nur dann ein PCR-Produkt zu erwarten, wenn YFP tatsächlich ins Genom integriert wurde. Das zweite Primerpaar (b) bindet außerhalb des Bereiches, in dem die Integration von YFP in das Genom stattfinden soll. Für dieses Primerpaar ist sowohl bei gelungener als auch bei misslungener Integration von YFP ein PCR-Produkt zu erwarten. Die Länge des PCR-Produktes ist allerdings abhängig davon, ob die Integration von YFP erfolgreich war. Das Produkt ohne Integration von YFP ist 720 bp kürzer als das Produkt, welches nach YFP-Integration entsteht.



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der Funktionsweise der Genotypisierungs-PCR zum Nachweis der Integration von YFP in ZNF423-Exon 4. Im unteren Bereich ist schematisch das Exon 4 von ZNF423 nach Integration von YFP ins Genom gezeigt. Im oberen Bereich sind die für die Genotypisierungs-PCR verwendeten Primerpaare durch Pfeile dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen Primerpaar a, welches nur bei gelungener Integration von YFP in einem PCR-Produkt resultiert. Die schwarzen Pfeile zeigen Primerpaar b, welches bei gelungener und misslungener Integration von YFP zu einem PCR-Produkt führt.

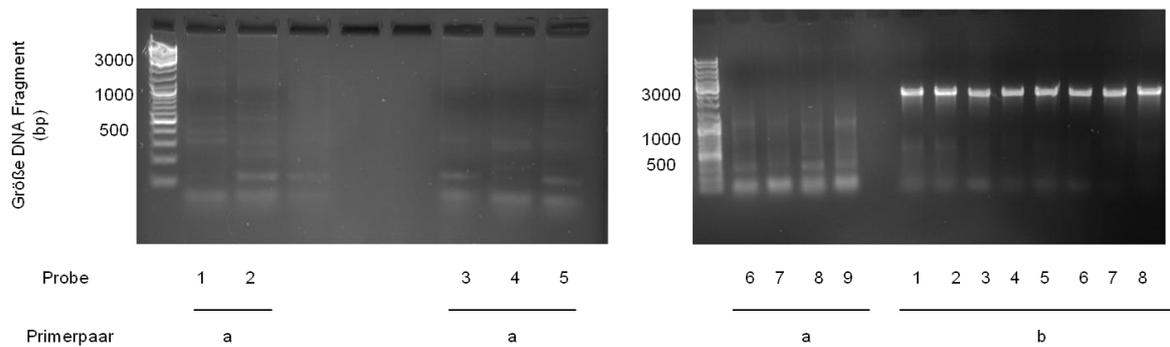
Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die zu erwartenden Längen der PCR-Produkte abhängig davon, ob die Integration erfolgt ist oder nicht.

**Tabelle 11:** Übersicht über die Größen der PCR-Produkte der Genotypisierungs-PCR in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar und der erfolgten oder nicht erfolgten Integration von YFP in Exon 4 von ZNF423.

Primerpaar	Bezeichnung Primer	Größe PCR-Produkt (bp)	
		YFP Integration erfolgt	YFP Integration nicht erfolgt
a	Genotyp up neu fw Genotyp YFP_rev	1198-1214*	kein PCR-Produkt
b	Genotyp up neu fw Genotyp down neu rev	2994	2274

\* Der exakte Ort der Integration des YFP zwischen den Bindungsstellen von TALEN links und TALEN rechts kann nicht vorhergesagt werden. Der Bereich, in dem die Integration stattfindet, ist 16 bp lang. Hierdurch kann auch die Länge des PCR-Produktes nicht exakt bestimmt werden.

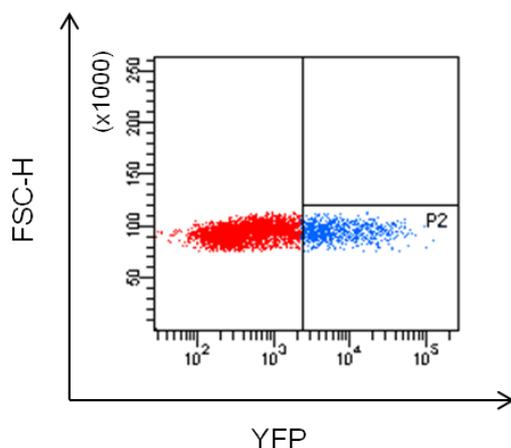
Aus den zuvor am FACS vermessenen Zellen wurde genomische DNA isoliert und damit die Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Für die PCR, die mit dem Primerpaar (a) durchgeführt worden war, entstand für keine der Proben ein PCR-Produkt. Für die PCR, die mit dem Primerpaar (b) durchgeführt worden war, entstand für alle Proben ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 2500 bp. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es nicht zu einer Integration von YFP in das vierte Exon von ZNF423 gekommen ist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den in Abbildung 25 gezeigten FACS Daten.



**Abbildung 27:** Überprüfung der PCR-Produkte der Genotypisierungs-PCR auf einem Agarosegel. Für jede Probe 1-9 wurde eine PCR mit Primerpaar (a) und eine PCR mit Primerpaar (b) durchgeführt. Probe 9 wurde für Primerpaar (b) nicht aufgetragen.

### 5.2.13 Transfektion des Matrix-Vektors in 293T-Zellen

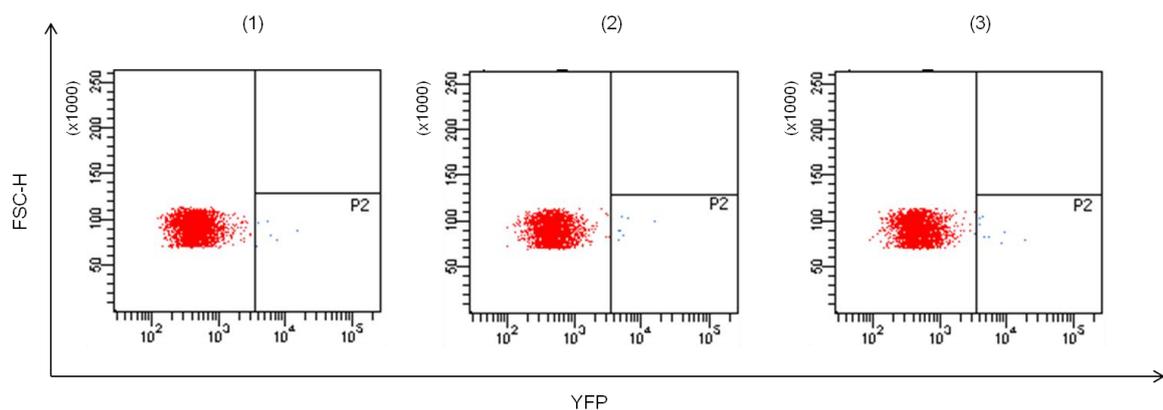
Um den Widerspruch zwischen im FACS YFP-positiven, in der Genotypisierungs-PCR aber YFP-negativen Zellen aufzuklären, wurden 293T-Zellen mit dem 2 µg pCR2.1\_Matrix-Vektor transfiziert, ohne dass TALENs transfiziert wurden. Die Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion am FACS auf YFP-positive Zellen untersucht. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse und den prozentualen Anteil der YFP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation. Es zeigte sich, dass auch bei alleiniger Transfektion der Matrix 17 % der Zellen YFP-positiv waren. Dies steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass es sich bei dem pCR2.1-Vektor nicht um einen Expressionsvektor handelt und ließ die Vermutung aufkommen, dass es sich bei der Expression des YFPs aus dem pCR2.1.-Vektor heraus um ein Phänomen der 293T-Zellen handelt.



**Abbildung 28:** Durchflusszytometrische Analyse von 293T-Zellen. Transfiziert wurden: 2 µg pCR2.1\_Matrix. In rot dargestellt sind alle in die Analyse eingeschlossenen Zellen. Im mit „P4“ bezeichneten Gate sind die YFP-positiven Zellen in blau abgebildet.

### 5.2.14 Transfektion des Matrix-Vektors in U2OS-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Expression von YFP aus dem pCR2.1\_Matrix\_Vektor um ein Phänomen der 293T-Zellen handelt, wurden U2OS-Zellen mit dem pCR2.1\_Matrix-Vektor transfiziert. In drei Proben wurden zusätzlich die TALENs transfiziert, in vier Proben erfolgte keine Transfektion der TALENs. Die Transfektionsansätze sind in Anhang 18 aufgeführt. Die Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion am FACS auf YFP-Positivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 gezeigt und die prozentualen Anteile der YFP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgeführt. Auch hier zeigte sich, dass sowohl ein Teil der Zellen, in die TALENs und pCR2.1\_Matrix transfiziert wurden, als auch ein Teil der Zellen, in die nur der pCR2.1\_Matrix Vektor transfiziert wurde, YFP-positiv waren. Der Anteil der YFP-positiven Zellen fiel jedoch wesentlich geringer aus als der Anteil der YFP-positiven 293T-Zellen (s. 3.2.13).



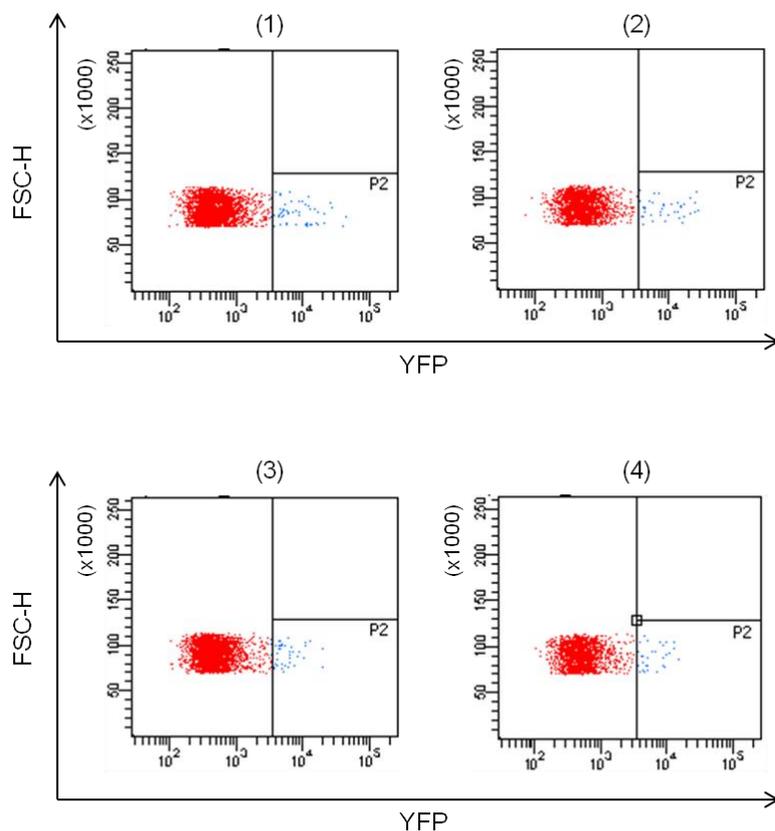
**Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse von U2OS-Zellen. Transfiziert wurden**

- (1) 0,25 µg links+0,25 µg TALEN rechts+0,5 µg pCR2.1\_Matrix
- (2) 0,5 µg TALEN links+0,5 µg TALEN rechts+1 µg pCR2.1\_Matrix
- (3) 1 µg TALEN links+1 µg TALEN rechts+1 µg pCR2.1\_Matrix.

Alle in die Analyse eingeschlossenen Zellen sind in rot dargestellt. Im als „P2“ bezeichneten Gate sind die YFP-positiven Zellen in blau dargestellt.

**Tabelle 12: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analyse der U2OS-Zellen aus Abbildung 29. Anteil der YFP-positiven Zellen an allen in die Analyse eingeschlossenen Zellen.**

Probe (Bezeichnung s. Abbildung 29)	Anteil YFP-positiver Zellen (%) an der getageten Population
(1)	0,2
(2)	0,3
(3)	0,4



**Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse von U2OS-Zellen. Transfiziert wurden**

**(1) 0,5 µg pCR2.1\_Matrix**

**(2) 1 µg pCR2.1\_Matrix**

**(3) 1,5 µg pCR2.1\_Matrix**

**(4) 2 µg pCR2.1\_Matrix.**

Alle in die Analyse eingeschlossenen Zellen sind in rot dargestellt. Im als „P2“ dargestellten Gate sind die YFP-positiven Zellen in blau dargestellt.

**Tabelle 13: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analyse der U2OS-Zellen aus Abbildung 30. Anteil der YFP-positiven Zellen an allen in die Analyse eingeschlossenen Zellen.**

Probe (Bezeichnung s. Abbildung 30)	Anteil YFP-positiver Zellen (%) an roten Zellen
(1)	2,0
(2)	2,1
(3)	1,6
(4)	1,7

## 6 Diskussion

### 6.1 Methylierungsstudien der ZNF423-CpG-Insel

Gegenstand dieser Arbeit ist das Zinkfingerprotein ZNF423, das in B-Zellen vieler ALL-Patienten überexprimiert ist. Die Bedeutung von ZNF423 für die Leukämogenese konnte bereits in einem Xenotransplantationsmodell der Maus nachgewiesen werden, das zeigte, dass eine Überexpression von ZNF423 zu einem Reifungsarrest von B-Zellen *in vivo* führt (Harder et al. 2013). Als mögliche Ursache für diese Überexpression wurde die in ALL-Patienten beobachtete Hypomethylierung einer CpG-Insel identifiziert, die einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität der ZNF423-Promotoren  $\alpha$  und  $\beta$  hat. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Positionen 102, 183, 220 und 250 der CpG-Insel, da es sich bei diesen Positionen um die im Vergleich zu immunologisch gematchten B-Vorläuferzellen und mononukleären Zellen des Remissionsknochenmarks am stärksten hypomethylierten Positionen der CpG-Insel handelt. Es stellte sich die Frage, ob diese besonders vom Methylierungsmuster gesunder Zellen abweichenden Positionen von besonderer Bedeutung für die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors sind. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Hypomethylierung dieser Positionen auf die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors zu bestimmen.

#### 6.1.1 Methylierungsstudien CpG-Insel mit ZNF423 $\alpha$ -Promotor

Im ersten Schritt wurde hierzu der Einfluss der Methylierung der CpG-Insel auf die Aktivität der ZNF423 $\alpha$ -Promotors mittels Reporterstudien ermittelt. Ein Vektorkonstrukt, welches sowohl die CpG-Insel als auch den ZNF423 $\alpha$ -Promotor enthielt, wurde jeweils mit den Methyltransferasen Sssl und Hhal methyliert. Anschließend wurde die Aktivität des Promotors mit Hilfe eines Luciferaseassays gemessen. Es zeigte sich, dass die Methylierung mit beiden Methyltransferasen zu einer deutlichen Verminderung der Promotoraktivität führt. Dieses mit den Erwartungen übereinstimmende Ergebnis lässt sich durch die Tatsache erklären, dass DNA-Methylierung zu einer Repression der Transkription führt. Die stärkere Unterdrückung der Promotoraktivität durch die Methylierung mit Sssl ist dadurch zu erklären, dass die Erkennungssequenz der Methyltransferase Sssl mit zwei Basenpaaren wesentlich kürzer ist als die Erkennungssequenz der

Methyltransferase HhaI mit vier Basenpaaren und SssI somit den Vektor an mehr Stellen als Substrat erkennt als HhaI. Hierdurch entstehen bei der Methylierung mit SssI mehr Methylierungen als bei der Methylierung mit HhaI und die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors wird dadurch stärker unterdrückt.

### **6.1.2 Methylierungsstudien der CpG-Insel Mutanten**

Um die Bedeutung der in ALL-Patienten am stärksten hypomethylierten Positionen für die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors zu ermitteln, wurden im nächsten Schritt Mutanten erzeugt, welche sich an den oben genannten Positionen in Bezug auf die Zugänglichkeit für die Methyltransferasen SssI und HhaI vom Wildtyp unterscheiden. Für die Erzeugung der Mutanten wurden zwei Konzepte verfolgt: Zum einen wurden Mutanten erzeugt, welche an den relevanten Positionen für die Methyltransferase SssI unzugänglich gemacht wurden. Zum anderen wurden Mutanten erstellt, die an den betroffenen Positionen für die Methyltransferase HhaI zugänglich gemacht wurden. Als Grundlage wurde auch hier der Vektor verwendet, in dem sowohl die CpG-Insel als auch der ZNF423 $\alpha$ -Promotor enthalten sind. Das Konzept, die in ALL-Patienten besonders hypomethylierten Positionen der CpG-Insel für die Methyltransferase SssI unzugänglich zu machen, basiert auf der Hypothese, dass eine verminderte Methylierung dieser Positionen durch die Methyltransferase SssI zu einer, verglichen mit dem Wildtyp, verringerten Repression der Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors führen würde. Das Konzept, die in ALL-Patienten besonders hypomethylierten Positionen der CpG-Insel durch Mutationen für die Methyltransferase HhaI zugänglich zu machen, beruht auf der Annahme, dass eine, im Vergleich zum Wildtyp, zusätzliche Methylierung dieser Positionen zu einer noch stärkeren Abnahme der Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors führen müsste. Nach Methylierung der Mutanten mit SssI und HhaI wurden auch hier Reporterstudien durchgeführt und die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors gemessen.

In den Reporterstudien mit den Mutanten, in denen die genannten Positionen für Methyltransferase SssI unzugänglich gemacht worden waren, zeigte sich, dass die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors unter Methylierung mit SssI wie erwartet bei den Mutanten weniger stark abnahm als die Aktivität des Wildtyps. Dieses mit der Hypothese sehr gut zu vereinbarende Ergebnis zeigt, dass allein die zusätzliche Methylierung einer einzelnen der in leukämischen Zellen besonders auffälligen

Positionen einen starken Einfluss auf die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors hat und lässt die Annahme zu, dass diese Positionen von besonderer Bedeutung für die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors sind. Neben drei Vektoren mit jeweils einer Mutation wurde ein weiterer Vektor verwendet, der Mutationen an allen vier Positionen gleichzeitig trägt. Im Vergleich zu den Einzelmutanten zeigte sich eine weniger geringe Abnahme der Aktivität als bei den Vektoren mit nur einer Mutation. Der erwartete, sich addierende Effekt für die Mehrfachmutante blieb aus. Dieses Phänomen ist möglicherweise durch veränderte sterische Eigenschaften oder Verlust von DNA-Bindungssequenzen für Transaktivatoren zu erklären, die durch die Mutagenesen zustande gekommen sein können.

In den Reporterstudien mit den Mutanten, in denen die in ALL-Patienten stark hypomethylierten Positionen der CpG-Insel für die Methyltransferase HhaI zugänglich gemacht wurden, zeigte sich, dass die Aktivität der Mutanten unter Methylierung mit HhaI nur geringfügig stärker abnahm als die Aktivität des Wildtyps unter Methylierung mit HhaI. Der erwartete Effekt konnte hier also nur in sehr kleinem Maße beobachtet werden. Um die Bedeutung dieser Positionen dennoch besser erfassen zu können, wäre es wünschenswert eine Mutante zu erzeugen, in der alle vier Positionen gleichzeitig für die Methyltransferase zugänglich gemacht werden.

### **6.1.3 Zusammenfassung Methylierungsstudien**

Zusammenfassend lässt sich aus den Methylierungsstudien schließen, dass die Methylierung der CpG-Insel die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors maßgeblich beeinflusst, indem sie dessen Aktivität unterdrückt. Wie stark die Promotoraktivität unterdrückt wird, hängt dabei von der verwendeten Methyltransferase und damit der Anzahl der Methylierungsstellen ab: Je mehr Positionen methyliert sind, desto größer ist die Unterdrückung der Promotoraktivität.

Die Methylierungsstudien der Mutanten der CpG-Insel ergaben, dass die Verhinderung der Methylierung an den Positionen, an denen das Methylierungsmuster bei ALL-Patienten am stärksten von dem gesunder Individuen abweicht, zu einer verminderten Abnahme der Promotoraktivität unter Methylierung führt.

Des Weiteren zeigte sich, dass allein die Tatsache, dass diese Positionen für eine Methylierung zugänglich gemacht werden, nicht zu einer maßgeblichen Reduktion der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp führt.

Die Frage, ob die Positionen 102, 183, 220 und 250 der CpG-Insel von ZNF423 von besonderer Bedeutung für die Regulation der Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors sind, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend beurteilen. Die Ergebnisse aus den Methylierungsstudien der Mutanten, an denen die Positionen für eine Methylierung unzugänglich gemacht wurden, weisen mit ihrer deutlichen Veränderung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp auf eine maßgebliche Rolle dieser Positionen hin. Wohingegen die Ergebnisse der Mutanten, in denen eine spezifische Methylierung der untersuchten Positionen möglich gemacht worden war, eher dagegen sprechen, dass den Positionen eine herausragende Rolle in der Regulation der Promotoraktivität von ZNF423 zukommt.

## **6.2 TALEN**

Die Überexpression von ZNF423 in leukämischen B-Zellen vieler ALL-Patienten führt über eine Interaktion mit dem Protein EBF1 zu einem Maturationsarrest von B-Zellen in vivo (Harder et al. 2013). Bisherige Versuche, die Überexpression von ZNF423 mittels RNA-Interferenz aufzuheben, waren nicht zufriedenstellend verlaufen (Zech 2012). Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es daher, mittels TALEN-Technologie, welche sich als Alternative zum klassischen Verfahren der RNA-Interferenz anbietet, sowohl einen Knock-out als auch eine Modifikation des ZNF423-Gens zu etablieren. Hierdurch sollte langfristig eine Möglichkeit geschaffen werden, in Mausmodellen zu überprüfen, ob durch die Aufhebung der Überexpression von ZNF423 die Differenzierungsblockade leukämischer B-Zellen durchbrochen werden kann.

### **6.2.1 Knock-out von ZNF423**

#### **6.2.1.1 ZNF423-Knock-out in 293T- und 697-Zellen**

Zur Etablierung des ZNF423-Knock-outs durch TALENs wurden 293T-Zellen gewählt, da in dieser Zelllinie mit lipidbasierten Transfektionsmethoden hohe Transfektionseffizienzen erzielt werden können. Die mit unterschiedlichen Mengen TALENs transfizierten 293T-Zellen zeigten, mit Ausnahme einer Probe, wider

Erwarten keine signifikante Reduktion der ZNF423-Expression. Da die Funktionsfähigkeit der TALENs durch die Herstellerfirma vor Auslieferung geprüft wird, ist anzunehmen, dass der fehlende Knock-out durch eine nicht optimale Anwendung zustande gekommen ist. Als Fehlerquellen kommen hier die transfizierten DNA-Mengen sowie der zeitliche Ablauf der Experimente in Frage. Trotz der Tatsache, dass sehr unterschiedlich hohe Mengen TALENs transfiziert wurden (0,1- 2 µg/TALEN), konnte nur in einer einzigen Probe mit einer mittleren Menge TALEN (0,5 µg/TALEN) eine signifikante Reduktion der ZNF423-Expression festgestellt werden. Die Reduktion der ZNF423-Expression in dieser Probe muss als Zufall gewertet werden, da dieses Ergebnis in einem weiteren unabhängigen Experiment nicht reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des Knock-outs ist, dass die transfizierten DNA-Mengen stark von der DNA-Menge abweichen, die für einen erfolgreichen Knock-out erforderlich wäre. Die transfizierte Menge TALENs könnte sowohl zu niedrig als auch zu hoch gewesen sein. Geringere Mengen TALENs zu transfizieren wäre möglich, eine Erhöhung der transfizierten Menge wäre mit der angewendeten Transfektionsmethode jedoch nicht durchführbar, da die maximal transfizierbare DNA-Menge in den Experimenten bereits erreicht war. Neben der Möglichkeit, dass die transfizierte Menge TALEN falsch gewählt wurde, könnte auch in der Art der Anwendung der TALENs ein Fehler unterlaufen sein. Als Anwendungsfehler ist eventuell der zeitliche Ablauf des Experiments in Betracht zu ziehen: Die durch eine GFP-Cotransfektion als transfiziert identifizierten Zellen wurden am dritten Tag nach der Transfektion am FACS aus der Gesamtpopulation isoliert. Diese Zellen mussten anschließend sofort für die RNA-Isolation lysiert werden, da es nicht möglich war, ein Verfahren zu etablieren, mit dessen Hilfe die Zellen nach der FACS-Isolation wieder in Kultur genommen werden konnten. Möglicherweise war durch diesen Ablauf zu wenig Zeit, in der die TALENs ihre Wirkung in den Zellen entfalten und zu einer geringeren ZNF423-Expression hätten führen können.

Trotz des in 293T-Zellen nicht eingetretenen ZNF423-Knock-outs wurde ein Versuch unternommen, den Knock-out in der für diese Arbeit relevanten Zelllinie 697 durchzuführen. Auch hier konnte in beiden Experimenten keine signifikante Reduktion der ZNF423-Expression nachgewiesen werden, insbesondere, da die große Standardabweichung beider Experimente eine Auswertung erschwert. Für

die Zellpopulation, aus der gleich am ersten Tag nach Transfektion die GFP-positiven Zellen isoliert und anschließend für 5 Tage wieder in Kultur genommen wurden, lässt sich die große Standardabweichung durch den schlechten Zustand erklären, in dem die Zellen sich nach der FACS-Sortierung befanden. Auch für die zweite Zellpopulation, aus welcher am ersten Tag nach Transfektion die GFP-positiven Zellen isoliert und direkt für RNA-Isolation lysiert wurden, kann der schlechte Zustand der Zellen als Grund für die hohe Standardabweichung angeführt werden. Die Transfektionsmethode der *Nucleofection*<sup>®</sup> stellt eine große Belastung für die Zellen dar und die anschließende FACS-Sortierung am nächsten Tag schädigt die Zellen zusätzlich. In beiden Zelllinien konnte kein Knock-out von ZNF423 nachgewiesen werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wäre es empfehlenswert, die transfizierte Menge TALENs zu optimieren und Bedingungen zu schaffen, unter denen am FACS gesortete Zellen nach dem Sort wieder in Kultur genommen werden können. So könnten die Zellen regenerieren, bevor sie auf ZNF423-Expression untersucht werden. Außerdem wäre es so möglich, TALEN-positive Zellen in Kultur zu halten.

#### 6.2.1.2 CEL-1 Assay

Ein Knock-out durch TALENs wird dadurch erreicht, dass die TALENs einen Doppelstrangbruch herbeiführen, welcher durch nichthomologes ‚*Endjoining*‘ repariert wird. Bei diesem fehleranfälligen Reparaturmechanismus der Zelle entstehen Punktmutationen, welche zum Knock-out des Gens führen.

Zum Nachweis dieser Punktmutationen wurde ein CEL-1 Assay gewählt, der auf der CEL-1 Nuklease *Surveyor* beruht, die Punktmutationen in doppelsträngiger DNA erkennt und die DNA am Ort der Punktmutation schneidet.

Der CEL-1 Assay konnte im Rahmen dieser Arbeit teilweise etabliert werden. Mit den zu erwartenden Ergebnissen waren zu Beginn die im Kit mitgelieferten Kontrollreaktionen durchgeführt worden. Im nächsten Schritt sollte das Verfahren auf einen im Labor existierenden Vektor übertragen werden, zu dem ein Gegenstück existiert, welches sich vom Ausgangsvektor nur durch eine Punktmutation unterscheidet. Die ersten Versuche mit diesen beiden Vektoren schlugen fehl, woraufhin das PCR System von einer Polymerase ohne Fehlerkorrektur (keine *proof-reading*-Funktion) zu einer Polymerase mit Fehlerkorrektur (mit *proof-reading*-Funktion) abgeändert wurde. Dieser Wechsel des PCR-Systems wurde unter der Annahme unternommen, dass die

Taq-Polymerase ohne *proof-reading*-Funktion bei der Amplifizierung der DNA-Abschnitte zu viele Fehler produziert und somit in den PCR-Produkten nicht mehr nur die eine, in den Vektoren bekannte Punktmutation existiert, sondern noch viele weitere, die dann dazu führen, dass die CEL-1 Nuklease an jeder Punktmutation die DNA schneidet und die DNA so in zahllose sehr kleine Fragmente geschnitten wird. Nach der Optimierung des PCR-Systems konnten nach Durchführung des Assays in den Proben, in denen ausschließlich Homoduplexe vorhanden waren, wie erwartet keine Schnittprodukte nachgewiesen werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Homoduplexe von der CEL-1 Nuklease mangels Punktmutation nicht als Substrat erkannt wurden. In der Probe, in der nach Hybridisierung der beiden unterschiedlichen Vektoren miteinander, sowohl Homo- als auch Heteroduplexe zu erwarten waren, zeigten sich drei Banden, was dem erwarteten Ergebnis entspricht. Der Assay konnte also auf andere Vektoren als die im Kit enthaltenen Kontrollvektoren erfolgreich übertragen werden.

Zukünftiges Ziel ist es, den Assay auf genomische DNA anzuwenden, welche aus Zellen isoliert wird, die mit den beiden oben genannten Vektoren transduziert wurden. Die Durchführung des Assays mit genomischer DNA transduzierter Zellen entspräche den Bedingungen, die herrschen würden, wenn man eine durch TALENs induzierte Punktmutation in Zellen nachweisen würde. Der Vorteil der Analyse der transduzierten Zellen gegenüber TALEN-transfizierten Zellen bei der weiteren Etablierung des Assays bestünde allerdings in dem sicheren Vorhandensein einer Punktmutation.

## **6.2.2 Modifikation von ZNF423 durch Integration von YFP\_stop**

### **6.2.2.1 Matrix und Kontrollvektoren pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex**

Neben dem Versuch einen ZNF423-Knock-out mittels TALENs zu erzielen, sollte das ZNF423-Gen mittels Homologer Rekombination nach TALEN-Transfektion durch die Integration eines YFPs modifiziert werden. Hierzu wurde zunächst ein Vektor erstellt, der als Reparaturvorlage für die Homologe Rekombination genutzt werden konnte und das in das ZNF423-Gen zu integrierende YFP mit terminalem Stoppcodon enthält („Matrix“). Außerdem wurden zwei Kontrollvektoren hergestellt: pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop und pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex. Beide

Vektoren enthalten die Sequenz von ZNF423. Außerdem wurde in beide Vektoren YFP an exakt der Stelle in die Sequenz von ZNF423 hineinkloniert, an der sich das YFP in Zellen nach TALEN- und Matrix-Transfektion sowie abgelaufener Homologer Rekombination befinden würde. Die beiden Kontrollvektoren unterscheiden sich lediglich durch ein Stoppcodon am Ende des YFPs voneinander.

Zunächst wurde mit Hilfe des Vektors mit Stoppcodon überprüft, ob ein in die Sequenz von ZNF423 integriertes YFP zu einem funktionsfähigen und somit im FACS detektierbaren YFP-Protein führt. Die mit diesem Vektor transfizierten Zellen waren im FACS eindeutig als YFP-positiv zu erkennen. Somit können Zellen, in denen die „echte“ Integration von YFP nach Homologer Rekombination funktioniert hat, durch dieses YFP-Signal am FACS identifiziert und isoliert werden.

Ziel des nächsten Schrittes war es, anhand dieses Vektors zu überprüfen, ob die Integration eines YFPs, welches ein terminales Stoppcodon beinhaltet, in die Sequenz von ZNF423 zu einem Funktionsverlust des ZNF423-Proteins durch vorzeitigen Abbruch der Translation führt. Hierzu wurde ein Luciferase Assay durchgeführt, in dem die Tatsache genutzt wurde, dass funktionsfähiges ZNF423-Protein die Aktivität von CD79b unterdrückt.

Der Vektor wurde dazu gemeinsam mit pcDNA3.1(+)\_ZNF423 und mit CD79b transfiziert. Wie erwartet wurde die Aktivität von CD79b unterdrückt.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Integration des YFPs mit dem terminalen Stoppcodon in die Sequenz von ZNF423 zu einem Funktionsverlust des ZNF423-Proteins führt, da dieses nicht mehr in der Lage ist, die Aktivität von CD79b zu unterdrücken. Übertragen auf die Situation in mit TALENs und Matrix transfizierten Zellen, in denen es nach Homologer Rekombination zu einer Integration des YFPs mit Stoppcodon gekommen ist, ist davon auszugehen, dass diese Zellen nicht mehr in der Lage sein werden, funktionsfähiges ZNF423-Protein zu bilden. Somit kann in Zellen neben der Modifikation von ZNF423 durch die Integration des YFPs gleichzeitig auch ein Knock-out von ZNF423 erreicht werden.

Mit Hilfe des Vektors pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop konnte die Situation wie sie in Zellen zu erwarten ist, in denen die Integration von YFP durch die TALEN-Technologie gelungen ist, nachempfunden werden. Diese Ergebnisse lassen es daher wahrscheinlich erscheinen, dass Zellen, in denen die Integration

eines YFPs mit Stoppcodon in ZNF423 gelingt, zwei wichtige Bedingungen erfüllen: Zum einen sind die Zellen über ihr YFP-Signal im FACS detektierbar, wodurch Populationen geschaffen werden können, die nur Zellen beinhalten, in welchen die Integration des YFPs erfolgt ist. Zum anderen ist davon auszugehen, dass in den Zellen, in denen YFP integriert wurde, im Falle einer homozygoten Integration kein bzw. im Falle einer heterozygoten Situation weniger funktionsfähiges ZNF423 gebildet wird.

Ähnliche Luciferase Assays wurden mit dem Vektor pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex durchgeführt, um herauszufinden, ob nach Integration eines YFPs ohne terminales Stoppcodon in die Sequenz von ZNF423 noch funktionsfähiges ZNF423-Protein gebildet wird. Es zeigte sich, dass die Aktivität von CD79b nach Integration eines YFPs ohne terminales Stoppcodon gehemmt wird. Es ist also davon auszugehen, dass auch nach Integration eines YFPs ohne Stoppcodon weiterhin funktionsfähiges ZNF423-Protein gebildet werden kann. Für spätere Experimente könnten so Kontrollpopulationen geschaffen werden, in denen ein YFP ohne terminales Stoppcodon in ZNF423 integriert wird.

#### 6.2.2.2 Modifikation von ZNF423 in 293T-Zellen

Das ZNF423-Gen in 293T-Zellen sollte durch die Integration eines YFPs mit terminalem Stoppcodon modifiziert werden.

Hierzu wurden 293T-Zellen mit TALENs und der Matrix transfiziert und anschließend im FACS auf YFP-Positivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in jeder Probe ein Teil der Population YFP-positiv war.

Da es sich bei dem Matrix-Vektor nicht um einen Expressionsvektor handelt, sollte YFP nur exprimiert werden, wenn es ins Genom der Zelle integriert wird, nicht aber, wenn der Vektor nach der Transfektion in die Zelle lediglich extrachromosomal verbleibt.

Daher ließen diese Ergebnisse zunächst darauf schließen, dass die Integration von YFP bei einem Teil der 293T-Zellen gelungen war.

Um das Ergebnis der FACS-Analyse auf DNA-Ebene zu bestätigen, wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt, die jedoch eine Integration von YFP in die Sequenz von ZNF423 nicht nachweisen konnte.

Zur Klärung dieses Widerspruches wurden 293T-Zellen in Abwesenheit von TALENs nur mit der Matrix transfiziert. Es zeigte sich, dass 17 % der Zellen im FACS YFP-positiv waren. Da es ohne die TALENs nicht zu einer nennenswerten

Integration von YFP in ZNF423 der Zellen gekommen sein kann, war nach diesem Experiment davon auszugehen, dass 293T-Zellen in der Lage sind, Proteine aus dem pCR2.1-Vektor heraus zu exprimieren. Für diese Tatsache sprach auch die Beobachtung, dass der Anteil der YFP-positiven Zellen sowohl bei den oben beschriebenen Zellen, welche mit TALENs und Matrix transfiziert worden waren, als auch bei den Zellen, welche nur mit der Matrix transfiziert worden waren, im Laufe der folgenden Tage schnell abnahm. Diese auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführende Beobachtung bestärkt die Annahme, dass YFP nicht integriert wurde.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Fähigkeit aus dem pCR2.1-Vektor Proteine zu exprimieren ausschließlich um ein Phänomen der 293T-Zellen handelt, wurden U2OS-Zellen untersucht. Die FACS-Analyse ergab, dass auch hier sowohl ein Teil der Zellen, die mit TALENs und Matrix transfiziert worden waren, als auch ein Teil der Zellen, die nur mit der Matrix transfiziert worden waren, YFP-positiv waren.

Insgesamt war der Anteil der YFP-positiven Zellen jedoch sehr niedrig und wesentlich geringer als der Anteil der YFP-positiven Zellen in den vergleichbaren Experimenten mit 293T-Zellen. Eigenfluoreszenz der Zellen kann als Ursache ausgeschlossen werden, da unbehandelte Kontrollzellen im FACS keine Eigenfluoreszenz zeigten. Es ist daher davon auszugehen, dass auch U2OS-Zellen in der Lage sind, Proteine aus dem pCR2.1-Vektor heraus zu exprimieren.

Der im Vergleich zu den 293T-Zellen geringere Anteil an YFP-positiven Zellen lässt sich über die unterschiedliche Transfizierbarkeit der beiden Zelllinien erklären. U2OS-Zellen zeigen wesentlich geringere Transfektionseffizienzen als 293T-Zellen, wenn die gleiche, lipidbasierte Transfektionsmethode verwendet wird.

Für zukünftige Experimente sollte daher das Konstrukt der Matrix in einen anderen Vektor übertragen werden, bei dem die Expressierung von Proteinen vorher ausgeschlossen wurde.

### 6.2.3 Zusammenfassung TALEN

Angestrebtes Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, zum einen einen Knock-out von ZNF423 zu erreichen und zum anderen eine Modifikation von ZNF423 mit Hilfe der TALEN-Technologie zu erzielen.

Der Knock-out konnte in den bisher getesteten Zelllinien noch nicht etabliert werden. Es gibt jedoch zahlreiche Ansatzpunkte für Verbesserungen, sodass in zukünftigen Versuchen die Bedingungen der Experimente weiter optimiert werden können. Eine wichtige Bedingung für die Durchführung der Knock-out-Experimente ist, dass der Knock-out nicht nur auf mRNA-Ebene mittels real time PCR nachgewiesen werden kann, sondern auch genomische Veränderungen, die den Knock-out bewirken, belegt werden können. Der hierfür geeignete CEL-1 Assay konnte erfolgreich angewendet werden, auch wenn die Umstände des Experiments noch nicht ganz denen des späteren Einsatzzwecks entsprachen. Die Anwendung dieses Assays auf ein System, welches den späteren Bedingungen zum Nachweis eines TALEN-Knock-outs gleicht, steht noch aus.

Auch eine Modifikation des ZNF423-Gens durch die Integration eines YFPs mit terminalem Stoppcodon konnte bis zum Ende dieser Arbeit nicht etabliert werden. Die durchgeführten Experimente zeigen jedoch bereits jetzt, dass das Konzept hinter der Modifikation grundsätzlich Erfolg versprechend ist.

Wichtige Erkenntnisse der Vorexperimente sind zum einen, dass ein in das ZNF423-Gen integriertes YFP seine Fähigkeit, im FACS detektiert zu werden, erhält. Zellen, in denen die Integration von YFP geglückt ist, können somit im FACS detektiert und isoliert werden. Zum anderen zeigte sich, dass der Matrix-Vektor so gewählt werden muss, dass eine Expression von nicht in die Zell-DNA integriertem YFP ausgeschlossen ist.

Dies muss insbesondere auch an der Zelllinie 697 getestet werden, welche für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist.

Schließlich konnte in den Vorexperimenten gezeigt werden, dass die Integration eines YFPs mit terminalem Stoppcodon in das ZNF423-Gen zu einem Funktionsverlust von ZNF423 führt. Mit der Modifikation kann also ein Knock-out erreicht werden und gleichzeitig können die Knock-out-Zellen im FACS detektiert werden.

Eine weitere Information, die den Vorexperimenten entnommen werden kann, ist die Tatsache, dass die Integration eines YFPs ohne terminales Stoppcodon nicht zum Funktionsverlust von ZNF423 führt. Hierdurch können in zukünftigen Experimenten geeignete Kontrollpopulationen geschaffen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass trotz des noch nicht erfolgten ZNF423-Knock-outs und der nicht geglückten Modifikation von ZNF423 die ersten Schritte getan sind, um ZNF423 stabil in vitro und in vivo auszuschalten und den Einfluss auf die Ausreifung von B-Progenitor-Blasten zu studieren.

## 7 Zusammenfassung

Harder et al. zeigten 2013, dass bei einer Vielzahl von ALL-Patienten eine Überexpression des Zinkfingerproteins ZNF423 nachgewiesen werden kann.

Eine der Ursachen für diese ZNF423-Überexpression ist die aberrante Hypomethylierung des ZNF423-Locus. Harder et al. identifizierten spezifische Positionen in der 5'-CpG-Insel des ZNF423-Promotors, die in ALL-Knochenmarkszellen andere Methylierungsmuster aufweisen als in gesunden Knochenmarkszellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass die Methylierung der CpG-Insel einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität des ZNF423-Promotors hat. Zum anderen konnte mittels Mutationsstudien nachgewiesen werden, dass die Verhinderung der Methylierung an den von Harder et al. identifizierten Positionen der CpG-Insel zu einer verminderten Abnahme der Promotoraktivität unter Methylierung der CpG-Insel führt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, einen Gen-Knock-down und eine Gen-Modifikation von ZNF423 zu bewirken, um später dessen Rolle für die Leukämogenese beurteilen zu können. Hierzu sollte eine am *Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg* neue Technologie, die *Transcription Activator-Like Effector* Nukleasen (TALENs), verwendet werden. Außerdem sollten Methoden etabliert werden, mit denen die Effekte der TALENs auf genomischer Ebene nachgewiesen werden können. Leider gelang es bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht, den gewünschten Knock-out oder die Gen-Modifikation durchzuführen. Es konnten jedoch wichtige Schritte auf dem Weg zur Etablierung der Methode erreicht werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- Baker M (2012) Gene-editing nucleases. *Nat. Methods*, Bd. 9 (1): 23–26.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell*, Bd. 128 (4): 669–681.
- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE (1999) Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, Bd. 189 (7): 1139–1148.
- Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F (2012) Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, Bd. 12 (4): 230–237.
- Case M, Matheson E, Minto L, Hassan R, Harrison CJ, Bown N, Bailey S, Vormoor J, Hall AG, Irving, Julie A E (2008) Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, Bd. 68 (16): 6803–6809.
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, Bd. 39 (12): e82.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, Bd. 186 (2): 757–761.
- Creutzig U, Dworzak M, Reinhardt D (1997) Akute myeloische Leukämie im Kindesalter [Online im Internet] URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-031l\\_S1\\_Akute\\_myeloische\\_Leuk%C3%A4mie\\_im\\_Kindesalter\\_2013-02.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-031l_S1_Akute_myeloische_Leuk%C3%A4mie_im_Kindesalter_2013-02.pdf) [Stand 31.10.2015, 14:46].
- Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, Bd. 8 (4): 286–298.
- Fazzari MJ, Grealley JM (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev. Genet.*, Bd. 5 (6): 446–455.
- Fey MF (2007) Normal and malignant hematopoiesis. *Ann. Oncol.*, 18 Suppl 1: i9-i13.
- Giubellino A, Burke TR, Bottaro DP (2008) Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, Bd. 12 (8): 1021–1033.
- Gökbuget N (2007) Akute lymphatische Leukämie. 1. Aufl., UNI-MED Verlag, Bremen, S. 20-21, 38.
- Gökbuget N, Hauswirth AW, Kneba M, Schanz U, Ottmann O (2012) Akute Lymphatische Leukämie [Online im Internet] URL: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/akute-lymphatische-leukaemie> [Stand 31.10.2015, 14:54].
- Gronemeyer H, Zelent A (2009) Fingering modulators of retinoic acid signaling identifies new prognostic marker for neuroblastoma. *Cancer Cell*, Bd. 15 (4): 249–251.

- Grundy GJ, Moulding HA, Caldecott KW, Rulten SL (2014) One ring to bring them all--the role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst.)*, Bd. 17: 30–38.
- Hagman J, Gutch MJ, Lin H, Grosschedl R (1995) EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *EMBO J.*, Bd. 14 (12): 2907–2916.
- Harder L (2012) Die epigenetische und transkriptionelle Regulation des Zinkfingerproteins ZNF423 und dessen Einfluss auf die Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter. Dissertation im Fach Biologie, Universität Hamburg.
- Harder L, Eschenburg G, Zech A, Kriebitzsch N, Otto B, Streichert T, Behlich A, Dierck K, Klingler B, Hansen A, Stanulla M, Zimmermann M, Kremmer E, Stocking C, Horstmann MA (2013) Aberrant ZNF423 impedes B cell differentiation and is linked to adverse outcome of ETV6-RUNX1 negative B precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.*, Bd. 210 (11): 2289–2304.
- Harrison CJ (2001) The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews*, Bd. 15 (1): 49–59.
- Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J (2000) OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*, Bd. 100 (2): 229–240.
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.*, Bd. 29 (8): 731–734.
- Hof J, Krentz S, van Schewick C, Körner G, Shalapour S, Rhein P, Karawajew L, Ludwig W, Seeger K, Henze G, Stackelberg A von, Hagemeyer C, Eckert C, Kirschner-Schwabe R (2011) Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, Bd. 29 (23): 3185–3193.
- Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.*, Bd. 10 (13): 1580–1594.
- Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen S, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui C, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG (2013) The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.*, Bd. 45 (3): 242–252.
- Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B (2011) Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol.*, Bd. 29 (8): 699–700.
- Isalan M (2012) Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nat. Methods*, Bd. 9 (1): 32–34.

- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, Bd. 3 (6): 415–428.
- Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 14 (1): 49–55.
- Kaatsch P (2013) Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse aus dem Jahresbericht 2012 [Online im Internet]  
URL: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ueber-uns/wichtigste-ergebnisse.html> [Stand 31.10.2015, 14:55].
- Kauffmann GW, Moser E, Sauer R (2006) *Radiologie*. 3. völlig überarbeitete Auflage, Elsevier Verlag, München, S. 42.
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, Bd. 27 (3): 247–254.
- Knippers R (2006) *Molekulare Genetik*. 9. komplett überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart, S.341.
- Lauberth SM, Rauchman M (2006) A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J. Biol. Chem.*, Bd. 281 (33): 23922–23931.
- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2011) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.*, Bd. 39 (1): 359–372.
- Lin H, Grosschedl R (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, Bd. 376 (6537): 263–267.
- McMahon MA, Rahdar M, Porteus M (2012) Gene editing: not just for translation anymore. *Nat. Methods*, Bd. 9 (1): 28–31.
- Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 66 (6): 1039–1056.
- Pui C, Relling MV, Downing JR (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, Bd. 350 (15): 1535–1548.
- Pui C, Robison LL, Look AT (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, Bd. 371 (9617): 1030–1043.
- Ramírez J, Hagman J (2009) The Mi-2/NuRD complex: a critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer. *Epigenetics*, Bd. 4 (8): 532–536.
- Sauerbrey A, Stammler G, Zintl F, Volm M (1998) Expression of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene (RB-1) in Acute Leukemia. *Leukemia and Lymphoma* (28): 275–283.
- Shortt J, Johnstone RW (2012) *Oncogenes in Cell Survival and Cell Death*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Bd. 4 (12): a009829.
- Tsai RY, Reed RR (1997) Cloning and functional characterization of Roaz, a zinc finger protein that interacts with O/E-1 to regulate gene expression: implications for olfactory neuronal development. *J. Neurosci.*, Bd. 17 (11): 4159–4169.
- Turner J, Crossley M (1999) Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 24 (6): 236–240.

Voskarides K, Deltas C (2009) Screening for mutations in kidney-related genes using SURVEYOR nuclease for cleavage at heteroduplex mismatches. *J Mol Diagn*, Bd. 11 (4): 311–318.

Watt PM, Kumar R, Kees UR (2000) Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, Bd. 29 (4): 371–377.

Zech A (2012) Einfluss des ZNF423 auf den Maturationsarrest von B-progenitor akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter. Bachelorarbeit im Studiengang Molekular Life Sciences, Universität Hamburg.

## 9 Anhang

**Anhang 1: Ausgangsvektoren und Primer für die Polymerase-Kettenreaktionen zur Erzeugung der Fragmente „upstream“, YFP und „downstream“. Zusätzlich Angabe der zu erwartenden Längen der Fragmente.**

Fragment	PCR-Primer	PCR Vorlage	Fragmentlänge (bp)
upstream	Matrix_upstream_fw Matrix_upstream_rev	Buffy DNA	431
YFP	YFP_matrix_fw YFP_matrix_rev	pLKO1_shRNA_scr_ YFP	720
downstream	Matrix_downstream_fw Matrix_downstream_rev	Buffy DNA	413

**Anhang 2: Pipettierschema für den Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRV und XhoI.**

Schritt	DNA (µg)	Fast- Digest EcoRV (µl)	Fast- Digest XhoI (µl)	Fast- Digest Puffer (µl)	Fast AP 1U/µl (µl)	Temperatur (°C)	Inkubations- zeit (min)
Ausschneiden YFP aus pCR2.1_YFP	4,5	1		5		37	30
Aufschneiden pCR2.1_ upstream	2,9	1		5	2	37	30
Ausschneiden downstream aus pCR2.1_ downstream	4,4		1	5		37	30
Aufschneiden pCR2.1_ upstream+ YFP	3,6		1	5	2	37	30
Aufschneiden pcDNA3.1(+) ZNF423_ Deletion+ Insertion_ EcoRV	1,9	1		5	2	37	30

**Anhang 3: Ausgangsvektoren, Primer und Zielvektoren der durchgeführten Mutagenese-Reaktionen.**

Ausgangsvektor	Primer	Zielvektor	Bezeichnung Zielvektor im Text
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_183_mutA_fw CpG_183_mutA_rev	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_del 183	CpG_del_183
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_220_mutA_fw CpG_220_mutA_rev	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_del 220	CpG_del_220
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_250_mutA_fw CpG_250_mutA_rev	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_del 250	CpG_del_250
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_102_mutA_fw CpG_183_mutA_fw CpG_220_mutA_fw CpG_250_mutA_fw	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_ del 102/183/220/250	CpG_del_102/ 183/220/250
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_183_Hhal_fw CpG_183_Hhal_rev	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_Hhal 183	CpG_Hhal_183
pCpGL CpG_ZNF423 Promotora	CpG_250_Hhal_fw CpG_250_Hhal_rev	pCpGL CpG_ZNF423 Promotora_Hhal 250	CpG_Hhal_250
pcDNA 3.1.(+)_ ZNF423	EcoRV_delet_pcDNA_fw EcoRV_delet_pcDNA_rev	pcDNA 3.1.(+)_ ZNF423_ Deletion EcoRV	
pcDNA 3.1.(+)_ ZNF423_ Deletion_ EcoRV	EcoRV_insert_OAZ_fw EcoRV_insert_OAZ_rev	pcDNA3.1.(+)_ ZNF423_Deletion+ Insertion_EcoRV	
pcDNA3.1(+)_ ZNF423_ Deletion+ Insertion_ EcoRV+YFP	Stop-weg-YFP_NEU3_fw Stop-weg-YFP_NEU3_rev	pcDNA3.1(+)_ ZNF423_ Deletion+ Insertion_ EcoRV+YFP_stop-ex	pcDNA3.1(+)_ YFP_stop-ex
pCR 2.1 Matrix	Stop weg Matrix fw Stop weg Matrix rev	pCR 2.1 Matrix_stop-ex	

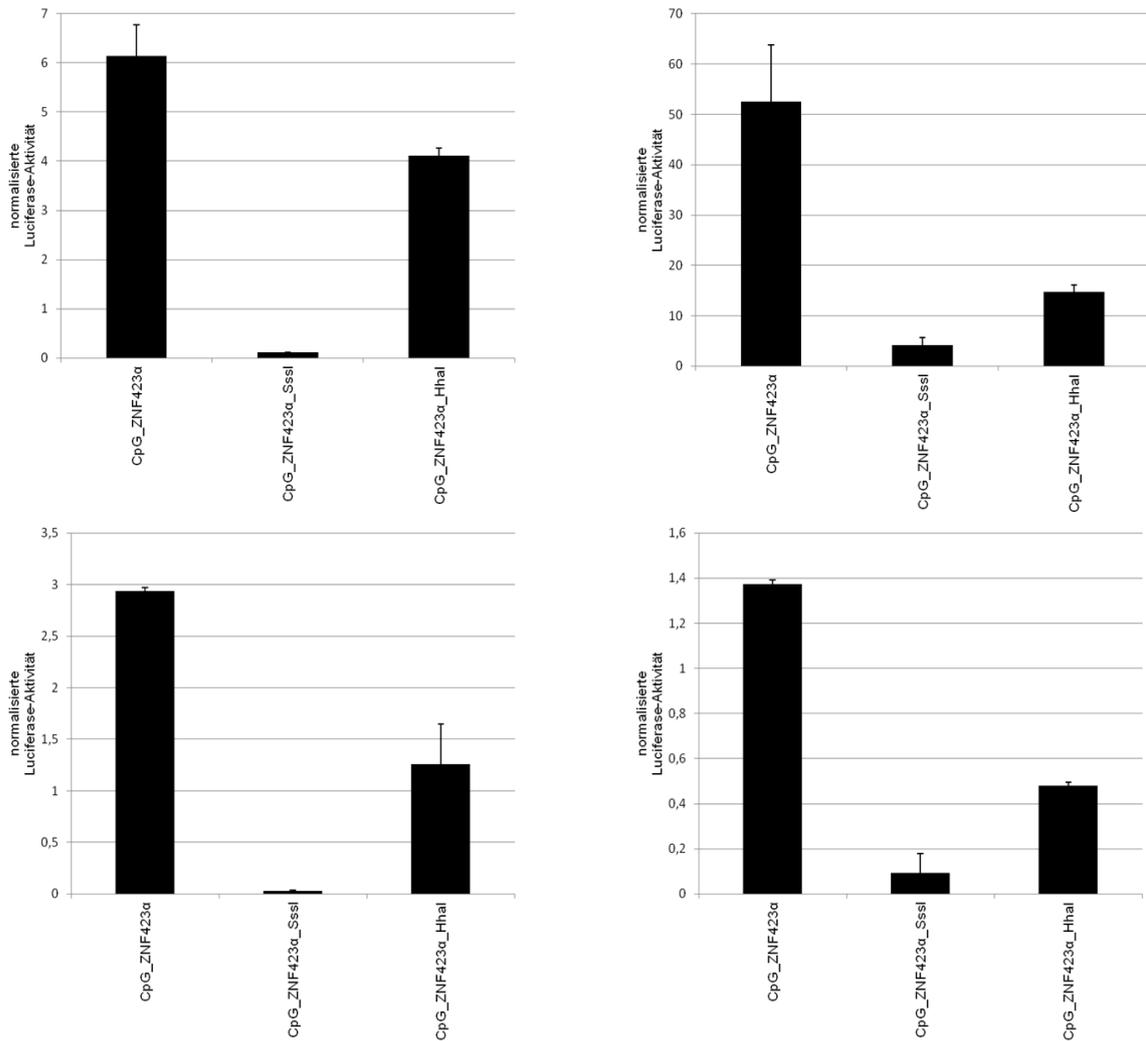
**Anhang 4: Pipettierschema für die mit der Methyltransferase Hhal durchgeführten Methylierungen.**

Probe	DNA (µg)	Methyltransferase Hhal 25000 U/ml (µl)	Puffer (µl)	SAM 160µM (µl)
CpG_ZNF423α_Hhal	10	1	3	3
CpG_del_183_Hhal	10	1	3	3
CpG_del_220_Hhal	10	1	3	3
CpG_del_250_Hhal	10	1	3	3
CpG_del_102/183/220/ 250_Hhal	10	1	3	3
CpG_Hhal_183_Hhal	10	6,25	3	1,5
CpG_Hhal_250_Hhal	10	6,25	3	1,5

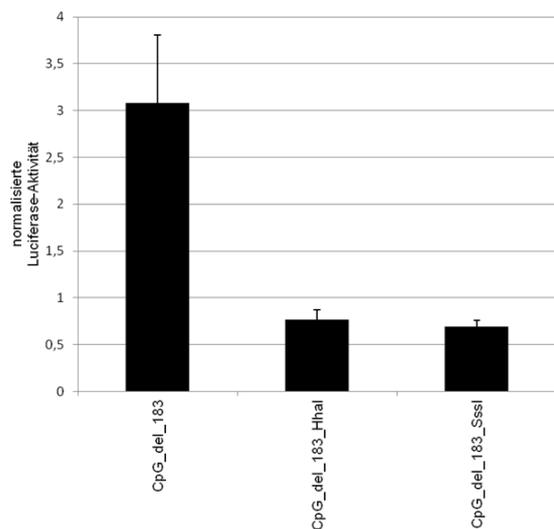
**Anhang 5: Pipettierschema für die mit der Methyltransferase Sssl durchgeführten Methylierungen.**

Probe	DNA (µg)	Methyltransferase Sssl 4000 U/ml (µl)	Puffer (µl)	SAM 160µM (µl)
CpG_del_183_Sssl	10	5	3	1,5
CpG_del_220_Sssl	10	5	3	1,5
CpG_del_250_Sssl	10	5	3	1,5
CpG_del_102/183/220/ 250_Sssl	5	5	3	6
CpG_Hhal_183_Sssl	5	5	3	6
CpG_Hhal_250_Sssl	5	5	3	6

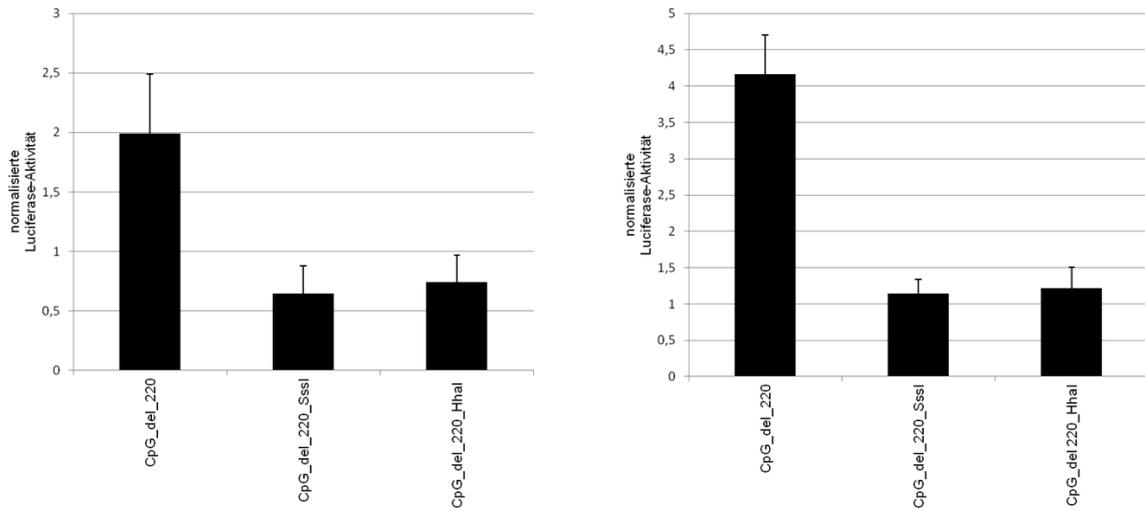
**Anhang 6: Die Methylierung der CpG-Insel und des ZNF423 $\alpha$ -Promotors beeinflusst die Aktivität des ZNF423 $\alpha$ -Promotors. Reporterstudie in 293T-Zellen. Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



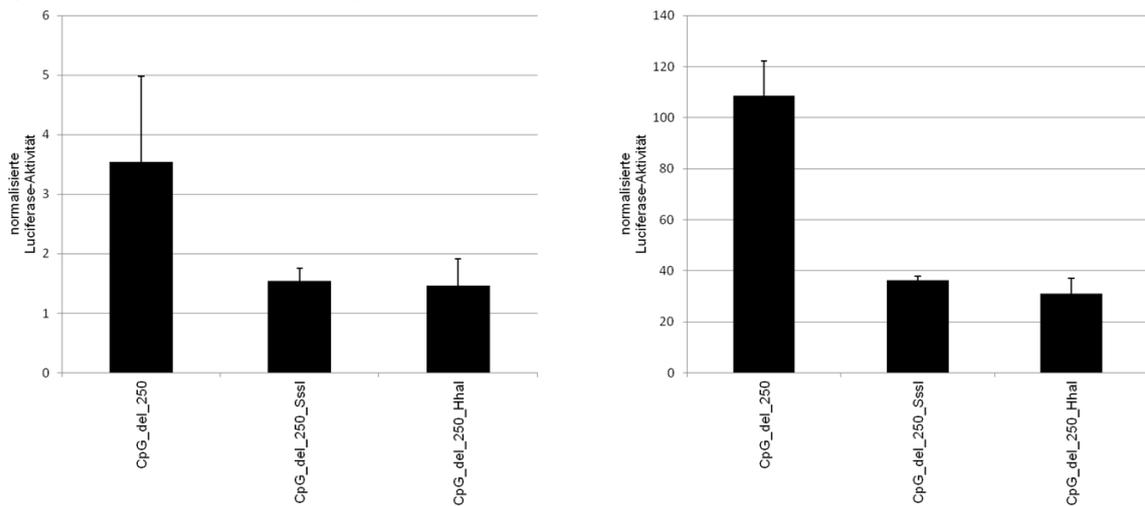
**Anhang 7: Reporterstudie der Mutante CpG\_del\_183 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen Hhal und Sssl methyliert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



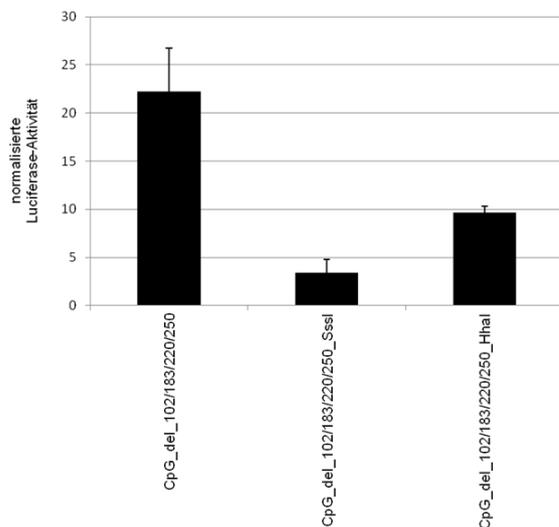
**Anhang 8: Reporterstudie der Mutante CpG\_del\_220 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen HhaI und SssI methyliert. Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



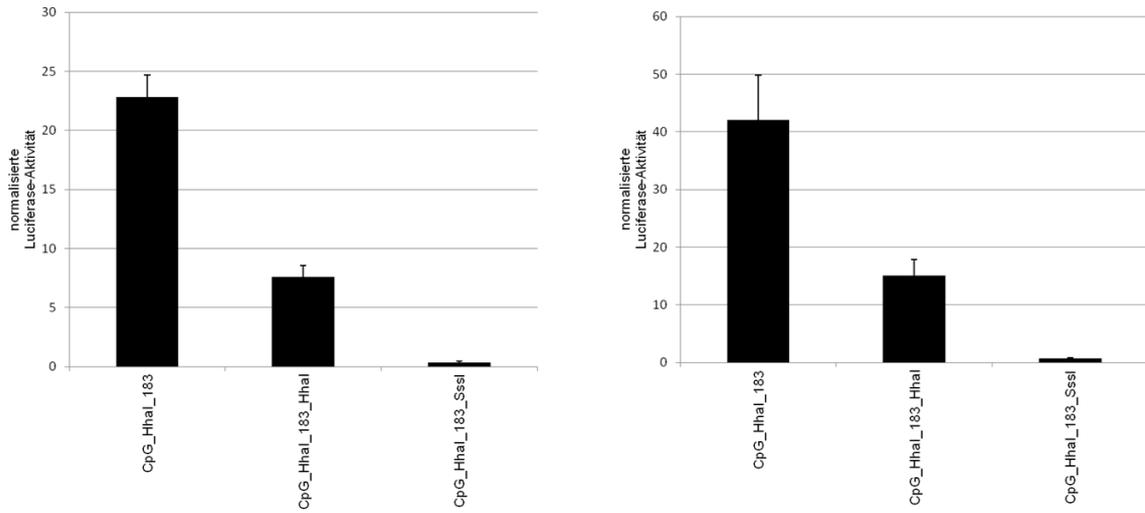
**Anhang 9: Reporterstudie der Mutante CpG\_del\_250 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen HhaI und SssI methyliert. Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



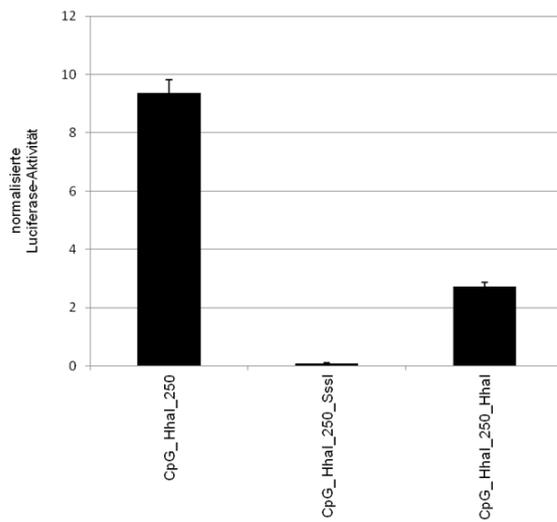
**Anhang 10: Reporterstudie der Mutante CpG\_del\_102/183/220/250 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen HhaI und SssI methyliert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



**Anhang 11: Reporterstudie der Mutante CpG\_HhaI\_183 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen HhaI und SssI methyliert. Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



**Anhang 12: Reporterstudie der Mutante CpG\_HhaI\_250 in 293T-Zellen. Die Mutante wurde mit den Methyltransferasen HhaI und SssI methyliert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.**



**Anhang 13: Pipettierschema für den Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop exprimierten ZNF423-Proteins.**

Probe	pGL3 CD79b (µg)	pcDNA3.1(+)_ZNF423 (µg)	pcDNA3.1(+)_YFP_stop (µg)	pcDNA3.1(+)(µg)
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)	0,2			0,2
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)_ZNF423	0,2	0,2		
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)_YFP_stop	0,2		0,2	

**Anhang 14: Pipettierschema für den Luciferase Assay zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des aus pcDNA3.1(+)\_YFP\_stop-ex exprimierten ZNF423-Proteins.**

Probe	pGL3 CD79b (µg)	pcDNA3.1(+)_EBF (µg)	pcDNA3.1(+)_ZNF423 (µg)	pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex (µg)	pcDNA3.1(+)(µg)
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)	0,2				0,4
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)_EBF+ pcDNA3.1(+)	0,2	0,2			0,2
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)_EBF+ pcDNA3.1(+)_ZNF423	0,2	0,2	0,2		
pGL3 CD79b+ pcDNA3.1(+)_EBF+ pcDNA3.1(+)_YFP_stop-ex	0,2	0,2		0,2	

**Anhang 15: Pipettierschema für die Transfektion von 293T-Zellen mit unterschiedlichen Mengen der TALENs zur Testung der Effizienz des ZNF423-Knock-outs.**

Probe	TALEN links (µg)	TALEN rechts (µg)	pcDNA3.1(+)(µg)	GFP (µg)
0,1 µg/TALEN	0,1	0,1		0,2
0,3 µg/TALEN	0,3	0,3		0,2
0,5 µg/TALEN	0,5	0,5		0,2
0,7 µg/TALEN	0,7	0,7		0,2
1 µg/TALEN	1	1		0,2
1,5 µg/TALEN	1,5	1,5		0,2
2 µg/TALEN	2	2		0,2
Kontrolle pcDNA3.1(+)			6	0,2

**Anhang 16: Pipettierschema für die Transfektion von 697-Zellen mit TALENs zur Testung der Effizienz des ZNF423-Knock-outs.**

Abbildung	Probe	TALEN links (µg)	TALEN rechts (µg)	pcDNA3.1(+) (µg)	GFP (µg)
Abbildung 20a	2 µg/ TALEN	2	2		0,4
Abbildung 20a	Kontrolle			4	0,4
Abbildung 20b	2 µg/ TALEN	2	2		1
Abbildung 20b	Kontrolle	4			1

**Anhang 17: Pipettierschema für die Transfektion von 293T-Zellen mit TALENs und dem Vektor pCR2.1\_Matrix.**

Probe Nummer	TALEN links (µg)	TALEN rechts (µg)	pCR2.1_Matrix (µg)
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1,5	1,5	0,75
5	1,5	1,5	1,5
6	1,5	1,5	3
7	1,5	1,5	4,5
8	2	2	2
9	2	2	3

**Anhang 18: Pipettierschema für die Transfektion mit U2OS-Zellen mit TALENs dem Vektor pCR2.1\_Matrix.**

Abbildung	Probe Nummer	TALEN links (µg)	TALEN rechts (µg)	pCR2.1_Matrix (µg)
29	1	0,25	0,25	0,5
29	2	0,5	0,5	1
29	3	1	1	1
30	1			0,5
30	2			1
30	3			1,5
30	4			2

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Martin Horstmann, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit am *Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg* durchzuführen und der diese Arbeit durch viele Anregungen und Ratschläge voranbrachte.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Lena Harder, die mir mit Rat zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Julia Strauss, die immer noch einen kleinen Tipp parat hatte, durch den alles ein bisschen besser funktionierte.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des Kinderkrebs-Zentrums für die Hilfe und Geduld, die mir entgegengebracht wurde.

Schließlich danke ich besonders meiner Familie für die geduldige Unterstützung während der gesamten Zeit und für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

## 11 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

## 12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....