

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg
und der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. med. Martin Horstmann

Hemmung des Zinkfingerfaktors ZNF423 in B-Vorläuferzellen der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters

Dissertation

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

vorgelegt von:

Mir Arasch Baha
Geboren in Kabul, Afghanistan

Hamburg, Oktober 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.05.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Eva Tolosa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter	1
1.2	Die Pathogenese der ALL	2
1.3	Die normale Hämatopoese	4
1.4	EBF1	6
1.5	ZNF423	6
2	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Chemikalien	13
3.2	Kits	13
3.3	Antikörper	13
3.4	Geräte	14
3.5	Biologisches Material	15
3.5.1	Bakterien	15
3.5.2	Zelllinien	15
3.6	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	15
3.7	Molekularbiologie	16
3.7.1	Expressionsplasmide	16
3.7.2	shRNA-Sequenzen	17
3.7.3	Plasmide für Reportergenanalysen	18
3.7.4	Plasmide für lentivirale Partikel	18
3.7.5	Medium für die Bakterienkulturen	19
3.7.6	Transformation von Bakterien	19
3.7.7	Plasmidisolation	19
3.7.8	Mutagenese	19
3.7.9	Sequenzierung	20
3.7.10	RNA-Isolation	20
3.7.11	Konzentrationsbestimmung	21
3.7.12	cDNA-Synthese	21
3.7.13	Real time PCR	21
3.8	Proteinbiochemie	22
3.8.1	Zellyse	22
3.8.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	23

3.8.3	SDS-PAGE	23
3.8.4	Western Blot.....	23
3.9	Zellkultur	24
3.9.1	Kultivierung von adhären-ten Zellen und Suspensionszelllinien	24
3.9.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
3.9.3	Reporter-ge-nalysen	25
3.9.4	Apoptose-assay	25
3.9.5	Proliferations-assay	26
3.9.6	Virus-produktion.....	26
3.9.7	Transduktion der Zelllinien.....	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Übersicht	28
4.2	Vorauswahl der richtigen shRNA-Sequenz	29
4.3	Etablierung eines Vektorsystems für die shRNA-Sequenz.....	30
4.4	Reporter-gen-studie und Transduktion von 697*-Zellen	32
4.5	ZNF423 Knockdown in verschiedenen ALL-Zelllinien	35
4.6	Transduktionseffizienz und Veränderungen in der Zellpopulation unter Knockdown-Bedingungen	37
4.6.1	REH-Zelllinie (ETV6-RUNX1)	37
4.6.2	SEM-Zelllinie (MLL-AF4).....	37
4.6.3	SUP B15-Zelllinie (BCR-ABL1)	39
4.7	Untersuchung der Apoptose mittels Annexin V / PI Färbung.....	39
4.7.1	REH-Zelllinie (ETV6-RUNX1)	39
4.7.2	SEM-Zelllinie (MLL-AF4).....	41
4.7.3	SUP-B15-Zelllinie (BCR-ABL1).....	42
4.8	Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation	44
4.8.1	SEM-Zelllinie (MLL-AF4).....	45
4.8.2	SUP-B15-Zelllinie (BCR-ABL1).....	46
5	Diskussion.....	47
5.1	Die shRNA-Sequenz shZNF423-#62 vermittelt einen ZNF423-Knockdown	47
5.2	ZNF423-Knockdown erhöht die CD79b-Promoteraktivität.....	47
5.3	697*-Zellen zeigen vermindertes Zellüberleben	48
5.4	REH-Zellen exprimieren kein messbares ZNF423 auf Proteinebene	48
5.5	ZNF423 beeinflusst Überleben und Wachstum von SEM-Zellen.....	49
5.6	ZNF423-Knockdown führt zur geringeren Proliferation in SUB-B15-Zellen	50
5.7	Abhängigkeit von ZNF423 in verschiedenen ALL-Zelllinien	50

5.8	RNA-Interferenz als Methode für die Gen-Inaktivierung	51
5.9	RNA-Interferenz als therapeutisches Werkzeug	52
5.10	Zukunftsperspektiven.....	53
6	Zusammenfassung	54
7	Abstract	55
8	Anhang	56
8.1	Abkürzungsverzeichnis	56
8.2	FACS Plots	58
8.2.1	697*-Zelllinie.....	58
8.2.2	REH-Zelllinie.....	61
8.2.3	SEM-Zelllinie	65
8.2.4	SUP-B15-Zelllinie	69
8.3	Abbildungsverzeichnis	73
8.4	Tabellenverzeichnis	74
9	Literaturverzeichnis.....	75
10	Danksagung	79
11	Lebenslauf.....	80
12	Eidesstattliche Erklärung.....	81

1 Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie (*ALL*) ist die häufigste Form der Leukämie im Kindesalter. Ursachen dieser Erkrankung sind genetische Aberrationen wie numerische Chromosomenanomalien und Translokationen, aber auch epigenetische Veränderungen können zu einer fehlregulierten Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren und damit einhergehend zu einem Maturationsarrest führen. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor für die B-Zelldifferenzierung ist EBF1, der durch eine aberrante Expression des Zinkfingerfaktors ZNF423 reprimiert werden kann. In dieser Arbeit wurden die Folgen einer RNA-Interferenz vermittelten Hemmung von ZNF423 in unterschiedlichen ALL-Zelllinien im Hinblick auf Apoptose und Proliferation untersucht.

1.1 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Die Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems und mit 30,6 % die häufigste Krebsart bei Patienten unter 18 Jahren¹. Man kann die Leukämien je nach Zelltyp unterteilen in myeloische und lymphatische Leukämien. Innerhalb der lymphatischen Leukämien können diese wiederum in B- und T-Zell-Leukämien sowie, je nach Verlaufsform, in akute und chronische Leukämien unterschieden werden.

Die akuten lymphatischen Leukämien treten besonders häufig im Kindesalter auf und machen 78 % aller Leukämien aus¹. Durch moderne Therapien ist die Überlebenschance mittlerweile auf über 85 % gestiegen². Die Nebenwirkungen dieser Behandlungen haben aber teilweise schwerwiegende Folgen wie z. B. sekundäre Tumore³. Um diese Behandlung schonender zu machen muss verstanden werden, wie diese Leukämien entstehen, um dann spezifische Therapien entwickeln zu können.

Ein Charakteristikum der ALL ist die nicht-limitierte Zellteilungs- und Proliferationsaktivität. Gleichzeitig besteht ein Differenzierungsblock

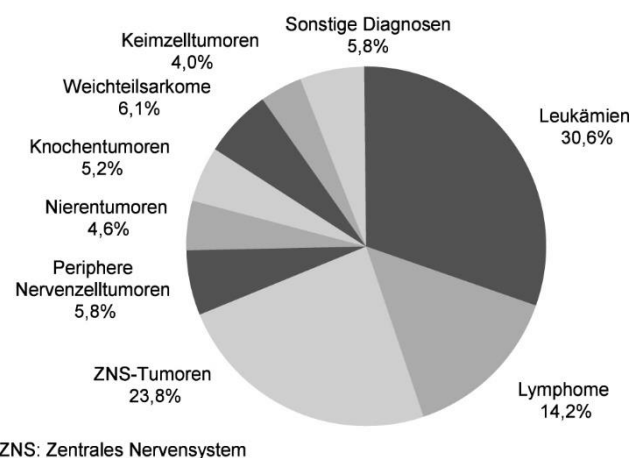


Abbildung 1: Statistik über maligne Erkrankungen bei unter 18-jährigen (nach deutschem Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2015¹)

und die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Apoptose³. Je nachdem, in welchem Reifungsstadium die Zellen sich befinden, kann man die B- und T-Zellleukämien weiter unterteilen. Bei der akuten B-Zell-Leukämie unterscheidet man die common-ALL, pro-B-ALL, prä-B-ALL und reife B-ALL⁴. Jeder dieser Leukämieformen weist einen Maturationsarrest in einem unterschiedlichen Reifestadium auf.

1.2 Die Pathogenese der ALL

Die ALL ist primär eine genetische Erkrankung. So zeigen 26 % der kindlichen ALL einen veränderten Karyotyp wie zum Beispiel hypo- oder hyperdiploide Chromosomensätze⁵. Auch Translokationen – die häufigsten unter ihnen sind die ETV6-RUNX1 und die BCR-ABL Translokation – werden in der ALL angetroffen⁵.

Die Translokation t(9;22) führt zum Philadelphia-Chromosom und kommt in 3 – 5 % der kindlichen sowie 25 – 40 % der adulten ALL vor⁶. Dabei entsteht das BCR-ABL Fusionsprotein, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase⁷. Dieses veränderte Protein verändert Signalwege wie JAK-STAT, NF-κB und RAS und hat so entscheidenden Einfluss auf die Induktion zur neoplastischen Transformation⁷. Die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Apoptose und können sich unabhängig von Wachstumsfaktoren vermehren⁷. Der gezielte Einsatz von ABL-gerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren in Kombination mit Chemotherapeutika und anschließender Stammzelltransplantation hat die Prognose dieser ALL-Form signifikant verbessert⁶.

Das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 entsteht durch die Translokation t(12;21) und ist mit ca. 25 % die häufigste Translokation der kindlichen ALL⁸. Diese ereignet sich schon *in utero* in einem frühen Vorläufer- oder Stammzellstadium, die Erkrankung bricht jedoch erst Jahre nach der Geburt aus⁸. Durch die Translokation wird ein Protein, bestehend aus der Proteininteraktionsdomäne von ETV6 und der Transaktivierungsdomäne von RUNX1, exprimiert, wodurch sich die Kapazität zum Selbsterhalt verändert^{5,9}. Die Mechanismen sind nicht genau geklärt, womöglich führt die ETV6-Domäne zu einer Veränderung der Funktion der RUNX1-Domäne von einem transkriptionellen Aktivator zu einem Repressor⁸. Die ETV6-RUNX1 - positive ALL hat mit konventionellen Therapien eine sehr gute Prognose¹⁰.

Im Gegensatz hierzu sind die MLL-Translokationen (*mixed lineage leukemia*) mit einer schlechten Prognose verknüpft¹¹. Sie treten häufig bei Kindern unter einem Jahr (10 % aller ALL entstehen bei Kindern < 1 Jahr) auf und zeichnen sich durch eine kurze

Latenzzeit und hohe Aggressivität aus¹¹. Die MLL-Translokationen führen zu Fusionsproteinen, bestehend aus dem N-terminalen MLL und einem von bislang >70 identifizierten C-terminalen Partnerproteinen¹². Die Translokation t(4;11), die zum Fusionsprotein MLL-AF4 führt, ist die häufigste¹¹ dieser Translokationen. Die Überlebensrate beträgt ca. 55 %^{13,14}. MLL-Translokationen führen zu veränderter Aktivität der HOX-Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung der Blutzellen eine wichtige Rolle spielen¹⁵.

Diese großen Veränderungen reichen jedoch meist nicht aus, um das komplette Bild einer ALL hervorzurufen (*Ausnahme hier wahrscheinlich die MLL-AF4 Translokation*¹¹). Kleinere kooperierende Mutationen führen zu empfindlichen Veränderungen innerhalb der Zelle. Solche Mutationen sind Amplifikationen, Deletionen und strukturelle Rekombinationen, die entweder als Punktmutationen vorkommen oder größere Bereiche der DNA umfassen¹⁶. Diese Mutationen betreffen Tumorsuppressorgene, sowie Gene, die den Zellzyklus regulieren¹⁷. Beispiele dafür sind das Tumorsuppressorgen p53, welches in 2 - 3 % der kindlichen ALL inaktiviert ist¹⁸ sowie das RAS-Gen, eine GTPase, welche durch die Mutation konstitutiv aktiviert wird und in 15 - 22 % der kindlichen ALL vorkommt¹⁹. Auch Transkriptionsfaktoren, die für die B-Zelldifferenzierung von Bedeutung sind, können durch eine Mutation zur Entstehung der ALL beitragen. In einer Studie mit 242 Patienten zeigten 40 % der B-Progenitor-ALL-Patienten Mutationen in Genen für die B-Zelldifferenzierung¹⁶. Am häufigsten war PAX5 mit 32 % der Fälle betroffen, aber auch in den Genen von EBF1 und IKZF1 zeigten sich Deletionen¹⁶.

Neben den genetischen Veränderungen können auch epigenetische Anomalien zur Entwicklung einer ALL beitragen. Dies sind Veränderungen, die nicht in der DNA-Sequenz zu finden sind²⁰, sondern hauptsächlich in der Histonmodifikation oder das Methylierungsmuster der DNA²¹ betreffen. Während posttranslationale Veränderungen der Histone auf verschiedensten Wegen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität haben^{20,21}, führen Methylierungen der DNA zur transkriptionellen Repression²¹. Diese Methylierungen finden meist an der C⁵-Position des Cytosinrestes von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) statt, welche im Promoterbereich von 60 % der humanen Gene vermehrt in Form von mindestens 200 Basenpaaren langen CpG-Inseln vorkommen^{22,23}. Durch gezielte Methylierungen und Demethylierungen können bestimmte Transkriptionsmuster geschaffen und somit verschiedene Gene exprimiert werden. So zeigen sich in den einzelnen B-Zell-Stadien

unterschiedliche, für das Stadium typische Methylierungsmuster²⁴. Durch welche Mechanismen diese Methylierungen gesteuert werden, ist nicht genau bekannt²⁵, pathologische Methylierungsmuster können aber zur Entstehung von Krebs beitragen²¹. Ein Beispiel hierfür ist H-RAS, eine konstitutiv aktivierte GTPase, die durch eine Hypomethylierung erhöht in der AML exprimiert wird²⁶.

1.3 Die normale Hämatopoese

Die menschlichen Blutzellen lassen sich unterteilen in die kernlosen Bestandteile wie die Erythrozyten und Thrombozyten sowie in die kernhaltigen Leukozyten. Während die Erythrozyten und Thrombozyten wichtige Aufgaben wie den Sauerstofftransport und die Hämostase übernehmen, ist die Hauptfunktion der Leukozyten die Immunabwehr. Die B-Zellen zählen als Lymphozyten ebenfalls zu den Leukozyten und machen neben den T-Zellen einen Teil des erworbenen Immunsystems aus. Ihre Hauptaufgaben sind die Zytokinausschüttung und die Antikörperproduktion. Wichtige Rollen spielen sie auch in der Transplantatabstoßung und der Tumormunität²⁷. Charakteristisch für die B-Zelle ist der B-Zellrezeptor, ein membrangebundenes Immunglobulin, welches Antigen-Epitope erkennt, bindet und die zelluläre Phagozytose vermittelt. Jede B-Zelle hat ihren eigenen individuellen B-Zellrezeptor, wodurch die Erkennung eines breiten Spektrums an Antigenen ermöglicht wird. Die Differenzierung von der hämatopoetischen Stammzelle bis zur reifen B-Zelle wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert und findet in den lymphatischen Geweben statt²⁸. Hierzu gehören die primären lymphatischen Gewebe – das Knochenmark und die fetale Leber – sowie die sekundären lymphatischen Gewebe – die Lymphknoten und die Milz.

Der erste Schritt der B-Zelldifferenzierung ist die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) zu frühen lymphoiden Vorläufern (ELP), die zu den lymphoiden Vorläuferzellen²⁹ weiterdifferenzieren. Durch die Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros (IKZF1) wird die Entstehung der lymphoiden Vorläufer reguliert. Die weitere Differenzierung wird durch die Transkriptionsfaktoren E2A und EBF1 reguliert, die die Expression wichtiger Gene wie PAX5 und RAG1/RAG2 aktivieren. PAX5 ist essentiell für die B-Zelldifferenzierung, da es einerseits Gene für die B-Zelldifferenzierung aktiviert und gleichzeitig nicht mit der B-Zelllinie vereinbare Gene reprimiert²⁹. So sind z. B. durch PAX5 aktivierte Gene essentiell für den prä-B-Zellrezeptor (prä-BZR)- und den B-Zellrezeptor (BZR)-

Signalweg, während die reprimierten Gene z. B. Zelladhäsionsmoleküle und Zellkernproteine exprimieren, die in der myeloiden Reihe sowie in T-Zellen vorkommen²⁹. Außerdem zeigen PAX5-defiziente B-Zellvorläufer eine erhöhte Proliferationskapazität und bleiben undifferenziert²⁹. Die Rekombinasen RAG1 und RAG2 beginnen bereits im ELP-Stadium mit der $D_H>J_H$ -Rekombination der schweren Kette der Immunglobulin Loci und beenden diese im pro-B-Stadium mit der $V_H>DJ_H$ -Rekombination^{29,30}. Diese schwere Kette bildet zusammen mit dem Heterodimer CD79a und CD79b sowie mit der vorläufigen leichten Kette, bestehend aus VpreB und IGLL1, den prä-BZR – ein membrangebundener Rezeptor – bei dem die leichte Kette und der variable Teil der schweren Kette Signale empfangen und über das CD79a/CD79b-Heterodimer in die Zelle weiterleiten können³¹. Dieser Schritt ist ein Kontrollpunkt in der B-Zelldifferenzierung, nur Zellen mit intaktem prä-BZR differenzieren weiter³², Zellen ohne intakten prä-BZR gehen in die Apoptose³³. Durch die $V_L>J_L$ -Rekombination im Stadium der kleinen prä-B-Zelle entsteht die leichte Immunglobulinkette, die die vorläufige leichte Kette des prä-BZR ersetzt und zusammen mit der schweren Kette den B-Zellrezeptor bildet³¹. Diese unreife B-Zelle emigriert in die sekundären lymphatischen Organe, um dort auszudifferenzieren. Durch den Kontakt mit Antigenen und T-Zellinteraktionen differenziert sie sich weiter zur Plasmazelle und sezerniert Antikörper. Ein Teil dieser Zellen wird zu Gedächtniszellen, um bei erneutem Antigenkontakt eine prompte Immunantwort gewährleisten zu können.

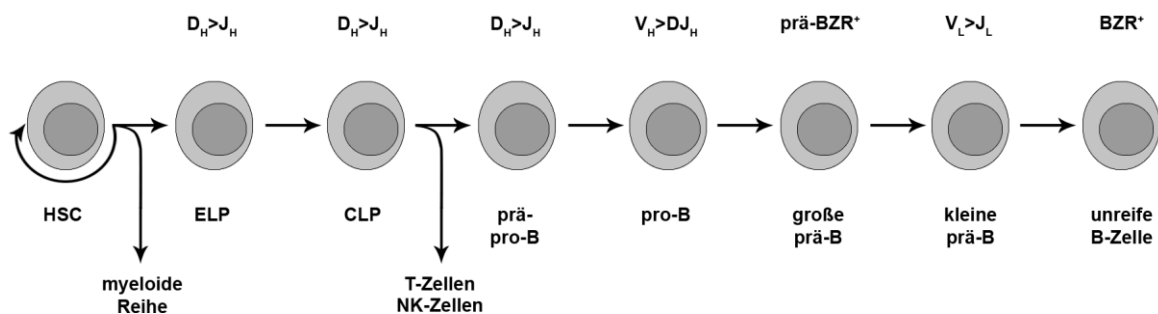


Abbildung 2: Die normale B-Zelldifferenzierung in den primären lymphatischen Organen

Die Zelldifferenzierung in den primären lymphatischen Organen beginnt mit der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) und endet mit der BZR-positiven unreifen B-Zelle. Diese wandert in die sekundären lymphatischen Organe und differenziert zur reifen B-Zelle, Plasmazelle und Gedächtniszelle. ELP = early lymphoid progenitor; CLP = common lymphoid progenitor. (nach Fuxa, M. & Skok J. A.²⁹)

1.4 EBF1

EBF1 ist essentiell in der B-Zell-Differenzierung. 1991 entdeckten Hagman et al. in Mäusen EBF1, einen Transkriptionsfaktor, der in der frühen B-Zelldifferenzierung das Gen *mb-1* (*CD79a*) reguliert³⁴. Wang et al. identifizierten 2 Jahre später ein Protein mit der gleichen Sequenz in olfaktorischen Neuronen und benannten es *Olf-1*³⁵. Welche wichtige Rolle EBF1 in der B-Zelldifferenzierung spielt, zeigte sich 1995, als die Differenzierung in EBF1-defizienten Mäusen untersucht wurde³⁶. Es zeigte sich, dass diese Mäuse keine Rekombination des Immunglobulin-Locus und keine Transkription der Gene *RAG1*, *RAG2*, *mb-1* (*CD79a*), *B29* (*CD79b*), *VpreB*, *λ5* (*IGLL1*) und *PAX5* vorweisen³⁶. Diese Gene waren allesamt Zielgene des Transkriptionsfaktors EBF1 (*RAG1*³⁷, *RAG2*³⁷, *CD79a*³⁴, *CD79b*³⁸, *VpreB*³⁹, *IGLL1*⁴⁰, *PAX5*³⁷). Üblicherweise bindet EBF1 als Homodimer an die DNA^{41,42}. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass EBF1 eine Protein-Protein-Interaktion mit ZNF423 eingehen kann, wodurch die Transaktivierung der EBF1 Zielgene inhibiert wird⁴³. In Patientenproben zeigte sich, dass leukämische Lymphoblasten im Vergleich zu den Lymphoblasten in Remission eine erhöhte ZNF423 sowie eine verminderte *CD79b* Expression aufweisen⁴⁴.

1.5 ZNF423

Das Krüppel-like C₂H₂ Zinkfingerprotein ZNF423 wurde erstmals 1997 als *Roaz* (*rat Olf-1/EBF1-associated zinc finger protein*) als direkter Interaktionspartner und Repressor von *Olf-1/EBF1* in Geruchsrezeptoren von Ratten entdeckt⁴³. Im Jahr 2000 wurde ZNF423 in Krallenfröschen als OAZ entdeckt, hier agierte es im BMP-Signalweg in der neuralen Entwicklung und im Mesoderm als transkriptioneller Aktivator⁴⁵. ZNF423 hat 30 Zinkfinger motive, die es ermöglichen, unterschiedliche Protein- und DNA-Bindungen einzugehen⁴⁶. Durch die unterschiedlichen Motive zeigt ZNF423 eine hohe Vielseitigkeit, es ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt und kann sowohl mit anderen Proteinen als auch mit der DNA interagieren.

Die Domäne 2-8 ermöglicht die Interaktion mit der DNA von ZNF423-Homodimeren, während die Domäne 9-13 die DNA-Bindungsdomäne des ZNF423-SMAD1-SMAD4-Komplexes im BMP-Signalweg darstellt^{45,47}. Außerdem kann über diese Domäne eine Proteininteraktion mit PARP1 innerhalb des Signalwegs für die DNA-Reparatur stattfinden⁴⁸. Über die Domänen 14-19 und 20-30 finden Proteininteraktionen statt: 14-

19 ist die Bindungsdomäne des SMAD1-SMAD4-Proteinkomplexes, Zinkfinger 20-30 ist die Bindungsdomäne für ZNF423 selbst oder EBF1^{44,45,47}. Die Isoform ZNF423 β hat zusätzlich zur Isoform ZNF423 α eine NID (*NuRD-interacting domain*), die es ihr ermöglicht mit dem NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*) -Komplex zu interagieren^{44,49}. Der NuRD-Komplex besteht aus Proteinen zur Histondeacetylierung und Chromatinstrukturierung und spielt so eine Rolle in der Genregulation⁴⁹. Die unterschiedlichen Isoformen werden durch verschiedene Promotoren reguliert und sind in humanen embryonalen Stammzellen sowie in primären akuten lymphatischen Leukämien co-exprimiert.⁴⁴

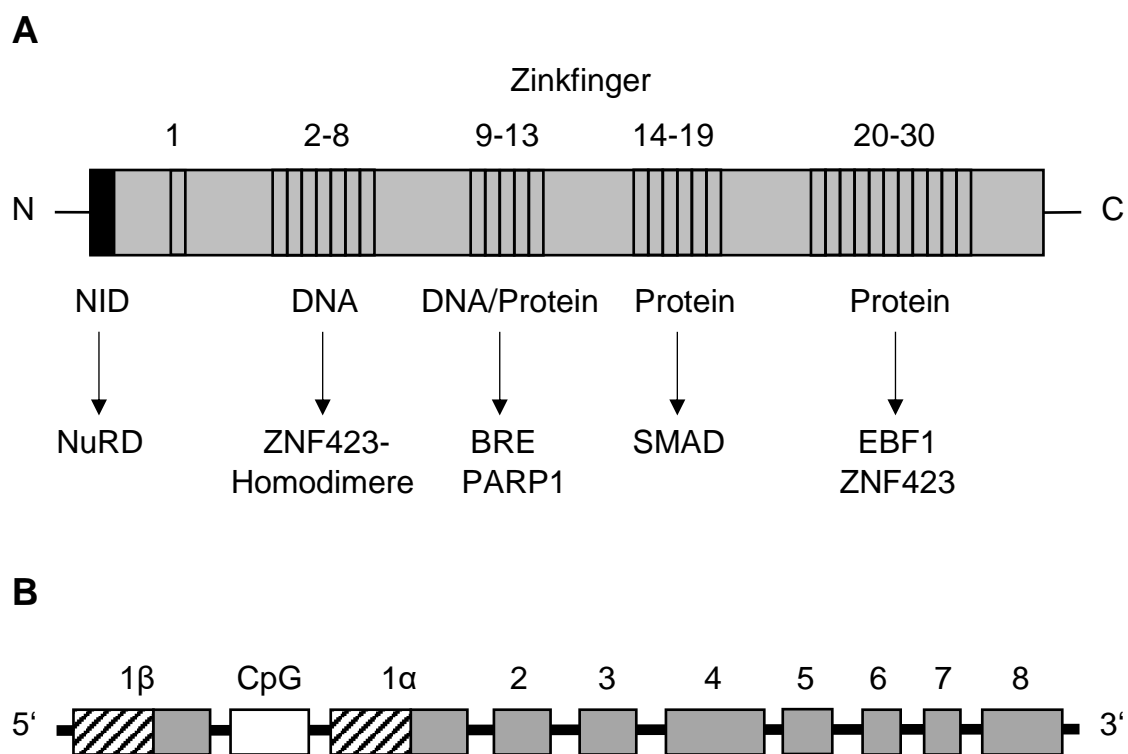


Abbildung 3: ZNF423 Struktur

(A) ZNF423 Protein mit seinen Zinkfingern. Der schwarze Balken ist die NuRD-interacting domain (NID), die bei der Isoform ZNF423 β vorkommt. BRE = BMP-responsive elements. (B) Das ZNF423-Gen. Die grauen Balken stellen die Exons dar. Die beiden Isoformen werden von unterschiedlichen Promotoren reguliert, dargestellt in den gestrichelten Boxen. Die weiße Box stellt die regulatorische CpG-Insel dar (nach Harder et al., 2014⁴⁶).

ZNF423 ist in verschiedenen Signalwegen involviert. Ein wichtiger unter ihnen ist der BMP-Signalweg. BMPs (*bone morphogenetic proteins*) bilden die größte Gruppe der TGF- β -Familie (*transforming growth factor β*)⁵⁰. Nach Ligandenbindung an den BMP-Rezeptoren, werden die Signale über die SMAD-Proteine in den Zellkern vermittelt. Erst durch Coaktivatoren oder Corepressoren entwickeln die SMAD-Proteine ihre Wirkung. Ein solcher Cofaktor nach BMP2/4-Stimulierung ist ZNF423. In embryonalem Gewebe – dort spielen BMPs eine zentrale Rolle – ist ZNF423 hoch exprimiert und somit wichtiger Regulator innerhalb des BMP-Signalwegs^{44,51}. In der Adipogenese ist ZNF423 ein regulierender Faktor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten, indem es unter anderem im BMP-Signalweg ein Cofaktor für die Aktivierung von PPAR γ darstellt, ein nukleärer Rezeptor für die Transaktivierung von Genen für die Adipogenese⁵². Die Relevanz von ZNF423 in der Neurogenese zeigten *Zfp423*^{-/-} Mäuse (*Zfp423 = murines ZNF423*), die kurz nach der Geburt starben und anatomische Defekte in Kleinhirn, Vorderlappen und Riechkolben aufwiesen^{53,54}. Die *Zfp423*-Expression in Geruchsrezeptoren führte zu einem frühen Differenzierungsstopp und zu einer Reprimierung der *Olf-1/EBF1* Zielgene⁵⁵. ZNF423 kann auch mit dem Notch1-Rezeptor interagieren und zusammen mit dem BMP-Signalweg die Expression von *Hes5* erhöhen. *Hes5* ist ein wichtiger Faktor in der neuronalen Entwicklung⁵⁶. Über den BMP-Signalweg werden wichtige Gene für die Neurogenese aktiviert. Auch hier zählt ZNF423 als ein Cofaktor⁴⁵. Im Zusammenhang mit Neuroblastomen ist ZNF423 ein Co-Aktivator des nukleären Heterodimers RAR/RXR (*retinoic acid receptor/retinoic X receptor*) nach Bindung von Retinsäure und führt zur Differenzierung dieser Zellen. ZNF423 ist hier ein prognostischer Marker; sein Fehlen ist mit zu einer schlechten Prognose verknüpft⁵⁷. Durch die Interaktion mit PARP1 könnte ZNF423 eine Rolle in der DNA-Reparatur spielen. PARP1 ist ein Enzym, welches andere Proteine an die Bruchstelle von Doppelstrangbrüchen rekrutiert⁵⁸. Mutationen von ZNF423 in den Zinkfingern 9-13 führen zur fehlerhaften Reparatur von Doppelstrangbrüchen und sind in der renalen Ziliopathie beschrieben⁴⁸.

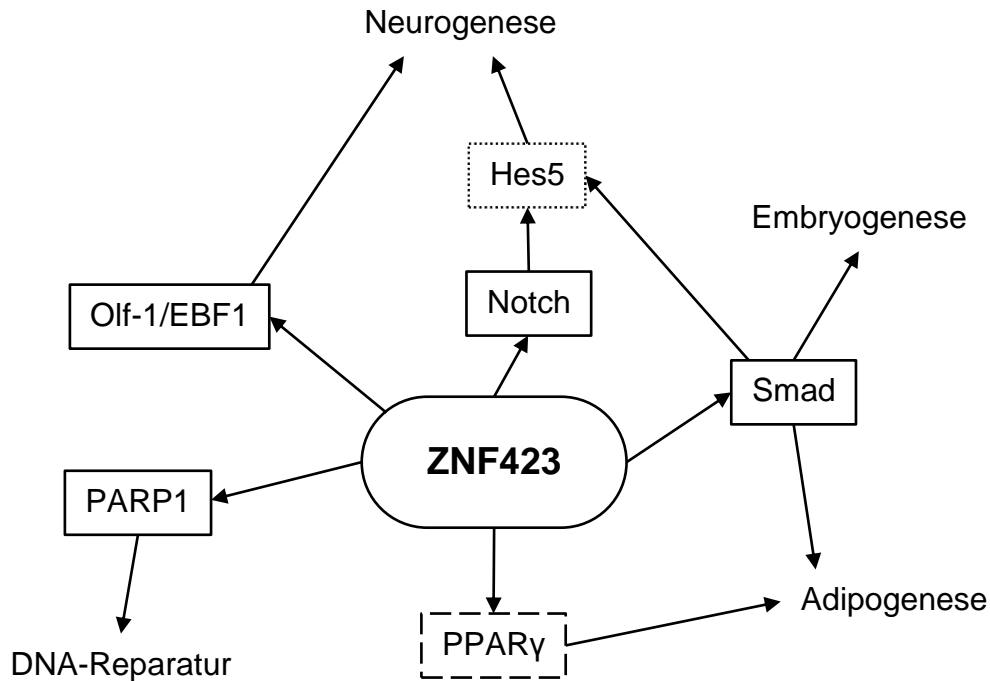


Abbildung 4: ZNF423 Interaktionen in gesundem Gewebe

Dargestellt sind die verschiedenen Signalwege, in denen der Transkriptionsfaktor ZNF423 eine Rolle spielt. Protein-Protein-Interaktion mit den durchgängig umrandeten Faktoren, Aktivierung der Gene mit der gestrichelten Umrandung und nachfolgend aktivierte Gene mit der gepunkteten Umrandung. (nach Harder et al. 2014⁴⁶)

Die ZNF423-Expression wird über eine Reihe von Mechanismen reguliert. Zum einen kann ZNF423 seine eigene Expression reprimieren, indem es die Fähigkeit besitzt an die transkriptionellen Enhancer in den Introns 3 und 5 seines Genes zu binden. Bei hohen Konzentrationen von ZNF423 führt es so zu einem Feedback-Mechanismus⁵⁹. In murinen Zellen zeigte sich, dass Zfp423 durch sein homologes Protein Zfp521 (*Zfp521 = murines ZNF521*) reprimiert werden kann, indem es an den Zfp423-Promoter und Enhancer in Intron 5 bindet⁶⁰. Außerdem zeigte sich in Neuroblastomzellen, dass bei einer *loss-of-function* Mutation im Neurofibromin 1 (*NF1*) -Gen das RAS-Protein übermäßig aktiv ist, welches zu einer transkriptionellen Repression von ZNF423 führt⁶¹. Somit führt eine normale NF1-RAS-MEK-Kaskade zur Expression von ZNF423. Auch eine Stimulation der Zelle durch BMP2/4 führt zu einer erhöhten Expression von ZNF423⁴⁴. Der BMP-Signalweg nimmt auf verschiedene Weise Einfluss auf die ZNF423-Expression. Es führt zu einer Repression von Zfp521 und somit durch die Abschwächung der repressiven Komponente zu einer erhöhten Expression von Zfp423⁶⁰. Außerdem zeigten sich am ZNF423-Gen nach BMP9-Stimulation erhöhte Mengen vom SMAD1-SMAD5-Komplex, ein Proteinkomplex im BMP-Signalweg, das zu einer Aktivierung der Transkription führt⁶². ZNF423 wird

überdies durch epigenetische Mechanismen reguliert. So zeigten Harder et al., dass sich zwischen den beiden Promotoren von ZNF423 α und ZNF423 β ein CpG-Insel befindet.⁴⁴ Methylierungen an CpG-Inseln führen, wie bereits erwähnt, zur transkriptionellen Repression²¹.

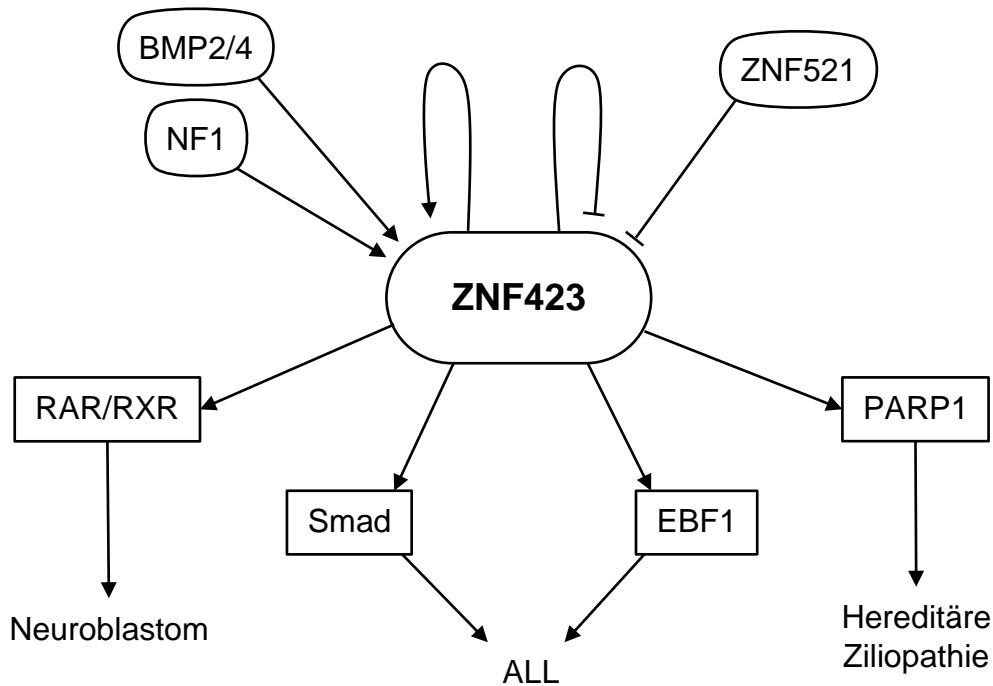


Abbildung 5: ZNF423 Regulation und Beteiligung in verschiedenen Erkrankungen

Dargestellt ist die Regulation von ZNF423 und ihre Beteiligung in verschiedenen Erkrankungen. Regulationsfaktoren in den abgerundeten Kästchen, Protein-Protein-Interaktionen mit den Faktoren in den eckigen Kästchen. (nach Harder et al.⁴⁶)

Normalerweise kommt ZNF423 in hämatopoetischen Zellen nicht vor, es spielt jedoch eine Rolle bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Es zeigte sich in murinen Lymphomen, dass Zfp423 ein Ziel retroviraler Integration ist und dadurch deutlich überexprimiert wird⁶³. Miyazaki et al. konnten außerdem zeigen, dass ZNF423 auch bei Patienten mit einer BCR/ABL⁺-CML während der Blastenkrise exprimiert wird und in Tierversuchen eine ZNF423 Überexpression zusammen mit der BCR/ABL-Translokation zur Leukämie führt⁶⁴. Harder et al. konnten 2013 zeigen, dass auch eine epigenetische Dysregulation zu einer aberranten Expression von ZNF423 führen kann⁴⁴. Durch die Fähigkeit von ZNF423 den Transkriptionsfaktor EBF1 zu sequestrieren kommt es zur Repression der EBF1-Zielgene, die wiederum wichtige Faktoren in der B-Zelldifferenzierung darstellen. Dies kann zu einem Maturationsarrest der B-Zellen führen⁴⁴. Außerdem wurde auch beschrieben, dass nach BMP2/4-

Stimulation die ZNF423-Expression steigt und, dass Leukämie-Zellen BMP2 erhöht exprimieren und somit selbstständig die ZNF423-Überexpression fördern⁴⁴. Dies alleine führt nicht zu einer Leukämie, ist aber ein Cofaktor und verbunden mit einer schlechten Prognose bei ETV6-RUNX1 - negativen, akuten B-Zellvorläuferleukämien⁴⁴.

2 Zielsetzung

Charakteristisch für die ALL im Kindesalter ist ein Maturationsarrest der B-Zellen, eine erhöhte Proliferation, sowie eine verringerte Apoptose. Ursachen können sowohl genetische als auch epigenetische Aberrationen sein, die dazu führen können, dass für die B-Zellmaturation essentielle Faktoren nicht mehr richtig funktionieren.

Grundlage dieser Arbeit war die Veröffentlichung von Harder et al. Sie konnten zeigen, dass der Zinkfingerfaktor ZNF423 in B-Zellvorläuferleukämien aufgrund von epigenetischer Dysregulation erhöht exprimiert sein kann. Da ZNF423 die Fähigkeit besitzt den Transkriptionsfaktor EBF1 zu sequestrieren, führt dies zur Reprimierung von dessen Zielgenen, für die B-Zellentwicklung wichtige Faktoren⁴⁴. Harder et al. konnten außerdem zeigen, dass eine ZNF423-Überexpression *in vivo* zu einer verminderten Anzahl B-Zellrezeptor-positiven Zellen führt und, dass in ETV6-RUNX1 - negativen B-Zellvorläuferleukämien eine ZNF423-Überexpression ein ungünstiger prognostischer Faktor ist⁴⁴.

Auf dieser Datengrundlage sollte nun in umgekehrter Weise untersucht werden, wie sich die Repression von ZNF423 auf den Phänotyp leukämischer B-Vorläuferzellen auswirkt. Ziel dieser Arbeit war es, durch den Mechanismus der RNA-Interferenz einen ZNF423-Knockdown zu etablieren und auf Transkript- und Proteinebene darzustellen. Anschließend sollte in verschiedenen ALL-Zelllinien ein ZNF423-Knockdown hervorgerufen werden, um die Auswirkungen auf Apoptose- und Proliferationsverhalten zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien für die Standardmethoden wurden bei Merck, Roth und Sigma Aldrich erworben. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH_2O) oder mit *Aqua ad iniectabilia* (Braun) angesetzt.

3.2 Kits

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Kits.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Kits

Name des Kits	Hersteller
APC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche
ProFection® Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate	Promega
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo Research
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

3.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind unterteilt in primäre Western Blot Antikörper (Tab. 2), sekundäre Western Blot Antikörper (Tab. 3) und Antikörper für die Durchflusszytometrie (Tab. 4).

Tabelle 2: Liste der primären Antikörper für Western Blots

Zielprotein	Klon	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Flag	M2	Maus	Sigma Aldrich	1:1.000
β-Aktin	AC-74	Maus	Sigma Aldrich	1:5.000

OAZ	E-6	Maus	Santa Cruz Biotechn.	1:1.000
Lamin B1	H-90	Kanninchen	Santa Cruz Biotechn.	1:1.000

Tabelle 3: Liste der sekundären Antikörper für Western Blots

Zielprotein	Hersteller	Verdünnung
IRDye® 800 CW Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	LI-COR	1:20.000
IRDye® 680 LT Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	LI-COR	1:20.000

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

Zielprotein	Hersteller	Verdünnung
Annexin V-APC	BD Biosciences	1:20
BrdU-APC	BD Biosciences	1:50

3.4 Geräte

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Geräte.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACS Canto	BD Bioscience
Odyssey CLx Infrared Imager	LI-COR
LightCycler® 480	Roche
T3000 Thermocycler	Biometra
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Infinite M200	Tecan
SORVALL® RC 5C Plus	Kendro Laboratory Products

3.5 Biologisches Material

3.5.1 Bakterien

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterienstämme JM109 und DH5 α genutzt. Die XL-10-Gold E. coli stammen von *Agilent Technologies*.

3.5.2 Zelllinien

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Die Angaben stammen aus der Datenbank der Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Anmerkung
293T (ACC 635)	Adhärente Zelllinie die ein Derivat der 293 Zelllinie (ACC 305) ist, entstammt der humanen embryonalen Niere und trägt ein Plasmid mit dem großen SV40 T-Antigen
REH (ACC 22)	Aus peripherem Blut etablierte humane B-Zellvorläuferleukämie, welche die Translokation t(12;21) trägt und zum ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) Fusionsgen führt
SEM (ACC 546)	Aus peripherem Blut etablierte humane B-Zellvorläuferleukämie, welche die Translokation t(4;11) trägt und zum MLL-AFF1 (MLL-AF4) Fusionsgen führt
SUP-B15 (ACC 389)	Aus Knochenmark etablierte humane B-Zellvorläuferleukämie, welche die Translokation t(9;22)(q34;q11) trägt und zur m-BCR Variante des BCR-ABL1 Fusionsgens führt
697* (ACC 42)	Entspricht laut STR-Analyse der Zelllinie 697, einer aus Knochenmark etablierten humanen B-Zellvorläuferleukämie

3.6 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 7 gibt eine Übersicht der verwendeten Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	Anmerkung
DMEM (1x)	Gibco/Invitrogen	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
RPMI 1640 (1x)	Gibco/Invitrogen	„Roswell Park Memorial Institute medium“
IMDM (1x)	Gibco/Invitrogen	„Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“
FBS	Gibco/Invitrogen	Fetal bovine serum
DPBS (1x)	Gibco/Invitrogen	„Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline“
L-Glutamine (100x)	Gibco/Invitrogen	200 mM
Sodium Pyruvate (100x)	Gibco/Invitrogen	100 mM
HEPES Buffer Solution	Gibco/Invitrogen	1 M
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco/Invitrogen	0,05 %
Opti-MEM® I (1x)	Gibco/Invitrogen	Reduced serum medium
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	Transfektionsreagenz
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen	Pen.: 10.000 U/ml, Strep.: 10 mg/ml
HBSS	Gibco/Invitrogen	„Hank’s Balanced Salt Solution“
Retronectin	TaKaRa	Humanes Fibronectin-Fragment
Chloroquin	Sigma Aldrich	25 mM in PBS

3.7 Molekularbiologie

3.7.1 Expressionsplasmide

Tabelle 8 gibt eine Übersicht der verwendeten Expressionsplasmide. Überwiegend wurde der pLKO.1-Vektor, aber auch der pcDNA3.1(+)-Vektor verwendet.

Tabelle 8: Auflistung der Expressionsplasmide

Plasmidname	Anmerkung	Resistenz
pLKO.1-YFP-empty	Leervektor, trägt eine YFP-Kassette	Ampicillin

pLKO.1-YFP-scr	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-scr, trägt eine YFP-Kassette	Ampicillin
pLKO.1 -tGFP-#62	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#62, trägt eine tGFP-Kassette	Ampicillin, Puromycin
pLKO.1 -tGFP-#63	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#63, trägt eine tGFP-Kassette	Ampicillin, Puromycin
pLKO.1 -tGFP-#64	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#64, trägt eine tGFP-Kassette	Ampicillin, Puromycin
pLKO.1 -tGFP-#66	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#66, trägt eine tGFP-Kassette	Ampicillin, Puromycin
pLKO.1 -tGFP-#74	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#74, trägt eine tGFP-Kassette	Ampicillin, Puromycin
pLKO.1-YFP-#62	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#62, trägt eine YFP-Kassette	Ampicillin
pLKO.1-YFP-#63	pLKO.1 mit der Sequenz shOAZ-#63, trägt eine YFP-Kassette	Ampicillin
pcDNA3.1(+)	Leervektor	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1(+)-Flag-ZNF423 α	pcDNA3.1(+) mit dem ZNF423 α -Gen, welches ein FLAG-tag trägt	Ampicillin, Neomycin

3.7.2 shRNA-Sequenzen

In Tabelle 9 sind die verwendeten shRNA-Sequenzen für die RNA-Interferenz aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung der shRNA-Sequenzen

Name	Sequenz	Region
shZNF423-#62	CCG GGG AGT ATC CTT GCA ATC AAT GCT CGA GCA TTG ATT GCA- AGG ATA CTC CTT TTT G	CDS
shZNF423-#63	CCG GCC TGA AAC TCA CCA AGC ACA TCT CGA GAT GTG CTT GGT- GAG TTT CAG GTT TTT G	CDS
shZNF423-#64	CCG GGA ACA TTA CAT CCA ATC AAA GCT CGA GCT TTG ATT GGA- TGT AAT GTT CTT TTT G	3'-UTR

shZNF423-#66	CCG GAG TCC TTC ATG GAG GTC TAT TCT CGA CDS GAA TAG ACC TCC- ATG AAG GAC TTT TTT G
shZNF423-#74	CCG GCC ACA TGA TTG AGG AAG GCA TCT CGA CDS GAT GCC TTC CTC- AAT CAT GTG GTT TTT
shZNF423-scr	GTC TCC ACG CGC AGT ACA TTT CGA GAA ATG - TAC TGC GCG TGG- AGA C

3.7.3 Plasmide für Reporteranalysen

Tabelle 10 gibt eine Übersicht der verwendeten Plasmide für die Reporteranalysen.

Tabelle 10: Auflistung der Plasmide für die Reporteranalysen

Plasmidname	Anmerkung	Resistenz
pGL3-basic	Leervektor	Ampicillin
pGL3-control	Positivkontrollvektor	Ampicillin
pGL3-CD79b-Promoter	Analysevektor	Ampicillin

3.7.4 Plasmide für lentivirale Partikel

Die Plasmide für die lentiviralen Partikel sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der Plasmide für die Virusproduktion

Plasmidname	Anmerkung	Resistenz
pMDLg-pRRE	Verpackungsplasmid für lentivirale Partikel, trägt das Gag-Gen und Pol-Gen	Ampicillin
pRSV-Rev	Verpackungsplasmid für lentivirale Partikel, trägt das Rev-Gen	Ampicillin
phCMV-VSV-G	Verpackungsplasmid für lentivirale Partikel, trägt das Env-Gen	Ampicillin
pLKO.1-YFP-#62	Expressionsplasmid	Ampicillin
pLKO.1-YFP-#63	Expressionsplasmid	Ampicillin
pLKO.1-YFP-scr	Expressionsplasmid	Ampicillin
pLKO.1-YFP-empty	Expressionsplasmid	Ampicillin

3.7.5 Medium für die Bakterienkulturen

Die kompetenten Bakterien wurden entweder in flüssigem lysogeny broth (*LB*)-Medium aufgenommen oder auf Agarplatten kultiviert. Das Difco LB Broth, Miller (*BD*) und das Difco LB Agar, Miller (*BD*) wurden nach Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

Tabelle 12: Rezept für das SOC-Medium

Medium	Zusammensetzung
SOC-Medium	0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

3.7.6 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wird die Hitzeschockmethode angewandt. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 2 µl Plasmid wurde hinzugegeben. Nach Vermengung durch auf- und abpipettieren wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock auf 42 °C für 45 s. Nach weiteren 2 min auf Eis gibt man 225 µl SOC-Medium hinzu und lässt es 1 h bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubieren. Anschließend kann man die Suspension entweder auf Agarplatten ausstreichen oder zu 100 ml LB-Medium zugeben und über Nacht bei 37 °C inkubieren lassen (*leichtes Schütteln beim LB-Medium*). Zur Lagerung wurde 87 %iges Glycerol zugegeben und bei -80 °C gelagert.

3.7.7 Plasmidisolation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die Kits für eine Minipräparation (*Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare*) oder eine Maxipräparation (*EndoFree® Plasmid Maxi Kit, QIAGEN*) verwendet. Für eine Minipräparation wurden 2 ml, für eine Maxipräparation 100 ml Bakteriensuspension verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in *Aqua ad iniectabilia (Braun)* gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.7.8 Mutagenese

Für die Insertion längerer Nukleotidsequenzen in ein Plasmid wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von *Agilent Technologies* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Transformation wurden

die XL10-Gold ultrakompetenten E. coli von *Agilent Technologies* verwendet. Tabelle 13 gibt eine Übersicht der verwendeten „Primer“-Sequenzen wieder.

Tabelle 13: Auflistung der Primersequenzen für die Mutagenese

Oligonukleotid	Sequenz 5' – 3'
sh-ZNF423-#62 fwd	GGA AAG GAC GAA ACA CCG GGG AGT ATC CTT GCA ATC AAT GCT CGA GCA- TTG ATT GCA AGG ATA CTC CTT TTT TGA ATT CTC GAC CT
sh-ZNF423-#62 rv	AGG TCG AGA ATT CAA AAA AGG AGT ATC CTT GCA ATC AAT GCT CGA GCA- TTG ATT GCA AGG ATA CTC CCC GGT GTT TCG TCC TTT CC
sh-ZNF423-#63 fwd	GGA AAG GAC GAA ACA CCG GCC TGA AAC TCA CCA AGC ACA TCT CGA GAT- GTG CTT GGT GAG TTT CAG GTT TTT TGA ATT CTC GAC CT
sh-ZNF423-#63 rv	AGG TCG AGA ATT CAA AAA ACC TGA AAC TCA CCA AGC ACA TCT CGA GAT- GTG CTT GGT GAG TTT CAG GCC GGT GTT TCG TCC TTT CC

3.7.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von *Applied Biosystems* nach Angaben des Herstellers. Die „Primer“-Sequenzen sind in Tab. 14 aufgelistet. Die Ansätze wurden von den Laboren der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf vermessen.

Tabelle 14: Übersicht der Primersequenzen für die Sequenzierung

Primer	Sequenz 5' – 3'
U6_Prom. fw	CGA TAC AAG GCT GTT AGA GAG A

3.7.10 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit von *Zymo Research* nach Angaben des Herstellers. Es wurden maximal 1×10^6 Zellen in 750 µl TRIzol® Reagent (*Life Technologies*) lysiert und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur entweder sofort für die RNA-Isolation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert. Die isolierte RNA wurde in 37 µl Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.7.11 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*) bestimmt.

3.7.12 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 3 µg RNA in 35 µl Wasser aufgenommen. Es wurden 1 µg Random Primers (*Promega*) und 5 µl peqGOLD dNTP Mix (*Peqlab*), der je 10 mM der vier Nukleotide enthält, hinzugegeben. Nach Erhitzung für 5 min auf 70 °C und Abkühlung für 5 Minuten auf 4 °C wurden dem Ansatz 10 µl M-MLV RT 5x Puffer (*Promega*), 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (*Promega*) und 40 U RNasin® Plus RNase Inhibitor (*Promega*) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Synthese für 60 min bei 37 °C. Durch Erhitzen für 5 min auf 95 °C wurde die Synthese beendet. Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

3.7.13 Real time PCR

Die Bestimmung der mRNA-Mengen erfolgte mittels quantitativer Real Time PCR mit dem LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit (*Roche*). Die Messungen wurden im technischen Triplikate an einem LightCycler® 480 (*Roche*) durchgeführt. Eine Übersicht des Temperaturprofils findet sich in Tabelle 15. Die benötigten „Primer“-Sequenzen wurden von Dr. Ann-Christin Puller zur Verfügung gestellt und sind in Tab. 16 aufgelistet. Die Spezifität der „Primer“ wurde anhand der Schmelzkurve überprüft und die relative Quantifizierung wurde durch die *Roche* LightCycler® 480 Software durchgeführt. Dabei wurde für die relative Expression eines Gens der $2^{-\Delta CT} \cdot 1000$ Wert berechnet und das Zielgen auf das Referenzgen B2M (β -2-Microglobulin) normalisiert. Die relativen Expressionsunterschiede zwischen zwei Proben wurden von der *Roche* LightCycler® 480 Software nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet.

Tabelle 15: Temperaturprofil der quantitativen RT-PCR

Schritt	Name	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	Denaturation	1	95 °C	10 min
2	Amplifikation	45	95 °C	10 s
			62 °C	10 s
			72 °C	10 s
3	Schmelzkurze	1	95 °C	1 s
			65 °C	15 s
			Endtemperatur: 95 °C	stetiges Erhitzen bei 0,11 °C/s
4	Kühlung	1	40 °C	30 s

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Primer für die quantitative RT-PCR

Primer	Sequenz 5' – 3'
B2M_qPCR	fw: TTC TGG CCT GGA GGC TAT C
	rev: TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC
ZNF423_qPCR	fw: GCA GAC CTG ACG GAC CAC
	rev: AGG CCA CCC AGG AGA GTT

3.8 Proteinbiochemie

3.8.1 Zellyse

Für die Herstellung von Zelllysate aus der gesamten Zelle bei überexprimiertem Protein, wurde der Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris (pH 6,8), 2,3 % SDS, 10 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau und 0,02 % Pyronin Y) eingesetzt, welcher gleichzeitig als Ladepuffer für die SDS-PAGE genutzt wurde. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 4300 rpm) und anschließend in 1 ml Laemmli-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 2 µl Benzonase (Sigma) zugegeben und nach kurzer Inkubation mit 5 % β-Mercaptoethanol versetzt. Dann wurde das Lysat 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder sofort für eine SDS-PAGE genutzt oder bei -80 °C gelagert. Für Zelllysate aus dem Zellkern, bei Nachweis von endogenem Protein, wurde das NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit von Thermo Scientific

nach Angaben des Herstellers genutzt. Für die SDS-PAGE wurde nur das Lysat aus dem Zellkern verwendet, dessen Proteinkonzentration bestimmt und 10-30 µg Protein eingesetzt. Als Ladepuffer wurde der NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) von *Life Technologies* genutzt.

3.8.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Um die Proteinkonzentration der Zellkernlysate zu bestimmen, wurden 4 µl Lysat mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate (*Bio-Rad*) zugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einer 96-well-Platte in einem Infinite M200 (*Tecan*) vermessen. Eine Standardkurve mit BSA (*Albumin Fraktion V, Roth*) mit 5 verschiedenen Konzentrationen (0 – 10,15 µg/µl) erlaubte die Berechnung der Proteinkonzentrationen.

3.8.3 SDS-PAGE

Damit man Proteine nach ihrer Größe auftrennen kann, wurde eine SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis“) durchgeführt. Als Gele wurden die NuPAGE 10% Bis-Tris Gele, als Laufpuffer der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x) (beides von *Life Technologies*) eingesetzt. Dem Laufpuffer wurden 500 µl NuPAGE® Antioxidant (*Invitrogen™*) zugesetzt. Der Größenstandard war der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von *ThermoFisher Scientific*. Die SDS-PAGE lief bei 150 V bis der blaue Farbstoff der Probenpuffer aus dem Gel gelaufen ist.

3.8.4 Western Blot

Um die nach Größe aufgetrennten Proteine zu detektieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine aus dem Acrylamidgel in einer Nass-Blotkammer auf eine Nitrocellulose-Membran (*Amersham™ Protran™ Premium 0,45µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane von GE Healthcare*) übertragen. Das „Blotting“ erfolgte entweder in CAPS-Puffer (10 mM CAPS mit 20 % Methanol) oder in TOWBIN-Puffer (25 mM Tris und 192 mM Glycin mit 20 % Ethanol) für 2,5 h bei 4 °C und 400 mA. Die Membran wurde danach mit Magermilchlösung (2 % Magermilchpulver (*Spinnrad*) in TBS-T (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 7,3) mit 0,1 % Tween-20)) für 30 min blockiert. Nach 3-maligem Waschen für je 10 min in TBS-T inkubierte der Erstantikörper in den entsprechenden Verdünnungen (s. Tab. 2) in

Magermilchlösung (5 % Magermilchpulver in TBS-T) bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 h. Danach wurde die Membran 3-mal je 10 min in TBS-T gewaschen, um anschließend den Zweitantikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tab. 3) in Magermilchlösung (5 % Magermilchpulver in TBS-T) zuzugeben, welcher bei Raumtemperatur 45 min inkubierte. Nachdem die Membran weitere 2-mal je 10 min in TBS-T gewaschen wurde, erfolgte ein letzter Waschgang für 10 min in TBS. Die Proteinbanden wurden am Odyssey CLx Infrared Imager (LI-COR) detektiert.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Kultivierung von adhärennten Zellen und Suspensionszelllinien

Die adhärennten Zellen und Suspensionszelllinien wurden in Zellkulturflaschen oder -platten im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die adhärennten Zelllinien wurden je nach Dichte alle 2-4 Tage gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt und Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Nach 5 min im Inkubator wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und bei einem Verhältnis von 1:10 mit neuem Medium versetzt. Suspensionszellen wurden je nach Angabe der Datenbank der Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 1-3-mal die Woche gesplittet. Die ideale Dichte für Suspensionszelllinien beträgt 1 x 10⁶ Zellen/ml (Ausname: Reh-Zelllinie mit 2 x 10⁶ Zellen/ml). Die Zellanzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor 10.000) bestimmt. Durch Färbung mit Trypanblau (Biochrom AG) konnten tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur.

Tabelle 17: Auflistung der Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
293T Medium	DMEM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat, 2 % HEPES, 1% Pen/Strep
REH/SEM/697* Medium	RPMI 1640 mit 20 % FBS
SUP-B15	IMDM mit 20 % FBS
Einfriermedium	90 % FBS + 10 % DMSO

3.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen pelletiert (5 min, 2000 rpm) und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zügig entweder bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Kurzzeitlagerung) oder in Flüssigstickstoff (Langzeitlagerung) gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in ein $37\text{ }^\circ\text{C}$ warmes Wasserbad gegeben. Nach vollständigem Auftauen wurde die Zellsuspension mit 10 ml DPBS verdünnt und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 – 10 ml Medium resuspendiert und im Inkubator kultiviert.

3.9.3 Reporteranalysen

Für die Reporteranalysen genutzten Plasmide wurden von Dr. Lena Harder kloniert und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Promotorsequenzen im Luciferasevektor pGL3. Positivkontrolle (*pGL3-control = konstitutiv aktiver Promoter*) und Negativkontrolle (*pGL3-basic = Leervektor*) wurden immer mitgeführt. Das Kontrollplasmid Renilla wurde zur internen Transfektionskontrolle eingesetzt. Als Zelllinie wurde die 293T-Zelllinie verwendet. Die Transfektion erfolgte durch Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. 48 h nach Transfektion wurde die Analyse mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assay System Kits von Promega nach Angaben des Herstellers an einem Infinite200 (Tecan) durchgeführt. Der Quotient aus der Luciferaseaktivität und der Renilla-Aktivität ist die relative Luciferaseaktivität.

3.9.4 Apoptoseassay

Um die Apoptose einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und zentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Annexin V Binding Buffer (BD Pharmingen™) resuspendiert. Zu 100 µl dieser Zellsuspension wurden 5 µl Annexin V-APC und 5 µl Propidium Iodide Staining Solution (beides BD Biosciences) zugegeben und nach kurzem durchmischen 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Binding Buffer fand die Messung an einem BD FACS Canto statt, die Auswertung erfolgte mithilfe der BD FACS Diva Software. Annexin V⁺/PI⁺ markierte Zellen wurden als spät-apoptotisch, Annexin V⁺/PI⁻ markierte Zellen als früh-apoptotisch gewertet. Zur Kontrolle wurden neben den Doppelfärbungen auch ungefärbte Zellen mitgeführt.

3.9.5 Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay wurde das APC BrdU Flow Kit (*BD Pharmingen*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch die Doppelfärbung mit BrdU-APC und 7-AAD kann der Zustand der Zellen in die verschiedenen Phasen unterteilt werden (*G0/G1, S, G2/M, apoptotisch*). Die Messungen fanden an einem *BD FACS Canto* statt, die Auswertung erfolgte mithilfe der *BD FACS Diva* Software. Zur Kontrolle wurden neben den Doppelfärbungen auch ungefärbte Zellen mitgeführt.

3.9.6 Virusproduktion

Für die Virusproduktion wurden am Vorabend 3×10^6 293T-Zellen in 10 ml Medium auf 10 cm Platten ausgesät. Am Tag darauf wurde das Medium mit frischem Medium ausgetauscht und 1:1000 mit 25 mM Chloroquin (*Sigma Aldrich*) versetzt. Die Transfektion erfolgte mit dem ProFection® Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate von *Promega*. Die dafür verwendeten Plasmide finden sich in Tab. 11. Nach 6 Stunden wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Die Virusernte erfolgte 24 h und 48 h später. Dafür wurden je 4 Platten desselben Konstrukts vereint und durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Filter filtriert. Das Filtrat wurde dann in einer Ultrazentrifuge (*SORVALL® RC 5C Plus, Kendro Laboratory Products*) bei 20.000 rpm und 4°C für 3 h zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1-2 ml Medium aufgelöst.

3.9.7 Transduktion der Zelllinien

Um die Zelllinien zu transduzieren wurde am Vorabend eine 6-well-Platte mit Retronectin (*TaKaRa, 48 $\mu\text{g/ml}$ in DPBS*) beschichtet und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Retronectin entfernt und mit 2 % BSA in DPBS für 30 min blockiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit HBSS mit 2,5 % HEPES. In die 6-well-Platte wurden dann je Position 6×10^6 Zellen in 2 ml Medium hineingegeben, um anschließend 1 ml des Viruskonzentrates, welches nach 24 h geerntet wurde, hinzuzugeben. Die 6-well-Platte wurde dann bei 2000 rpm für 1 h zentrifugiert und im Inkubator kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die Prozedur wiederholt, dafür wurden die Zellen in eine neue, mit Retronectin beschichtete 6-well-Platte überführt und die konzentrierten Viruspartikel aus dem 48 h-Überstand hinzugegeben. Bei der Zelllinie SUP-B15 wurde eine doppelte *multiplicity of infection* verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde an den darauffolgenden Tagen

durchflusszytometrisch überprüft. Die Messungen fanden an einem *BD FACS Canto* statt, die Auswertung erfolgte mithilfe der *BD FACS Diva* Software.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

Um die Auswirkungen einer Repression von ZNF423 in ALL-Zelllinien untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit der Mechanismus der RNA-Interferenz genutzt. Hierzu wurde in 293T-Zellen ZNF423 überexprimiert, um dann aus einer Auswahl von 5 verschiedenen shRNAs auf Transkript- und Proteinebene zu untersuchen, ob ein ZNF423-Knockdown vermittelt werden konnte. Die shRNA-Sequenzen mit der höchsten Knockdown-Effizienz wurden anschließend in einen Vektor mit einer guten Transduktionseffizienz kloniert.

Nach Etablierung des Knockdowns und des Vektorsystems wurden mittels einer Reporterstudie in 293T-Zellen und einer FACS-Analyse von 697*-Zellen erste Folgen eines ZNF423-Knockdowns untersucht, um anschließend die Veränderungen von Apoptose und Proliferation unter ZNF423-Knockdown-Bedingungen in den ALL-Zelllinien REH, SEM und SUP-B15 zu untersuchen.

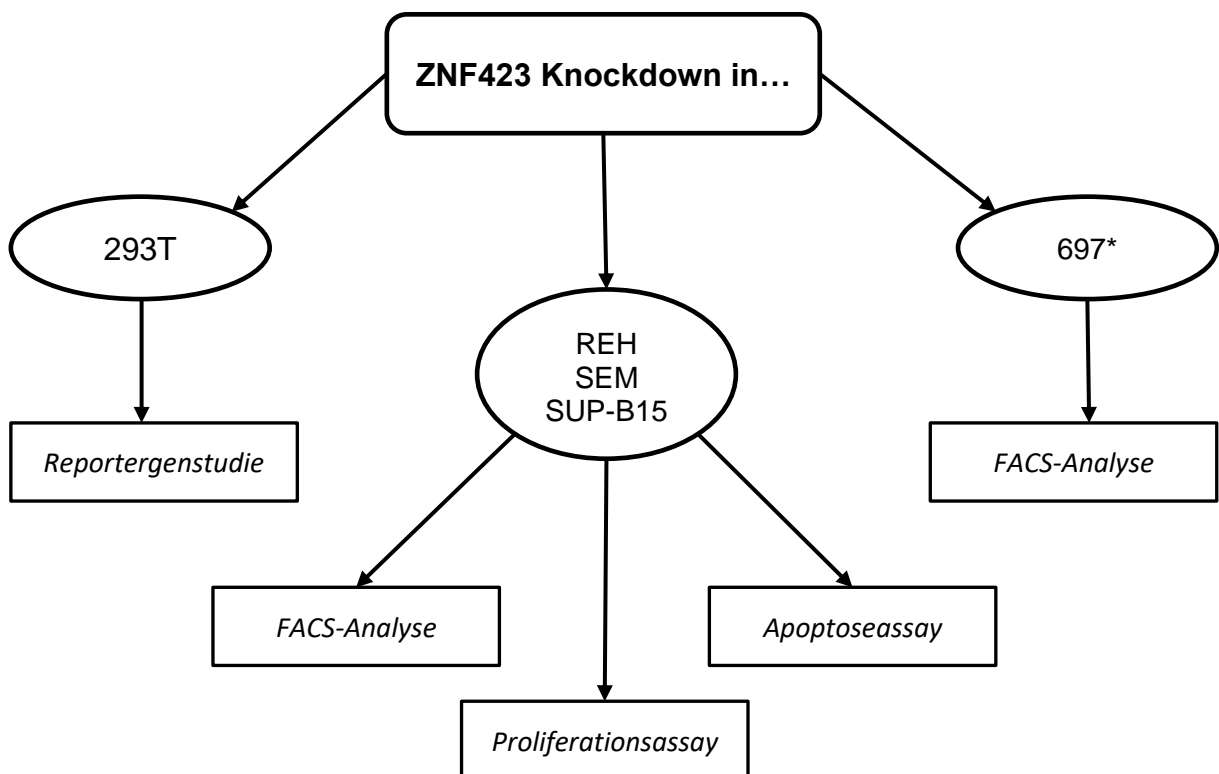


Abbildung 6: Übersicht der verschiedenen Untersuchungen in den einzelnen Zelllinien

Nach Etablierung eines Knockdown- und Vektorsystems wurden die Untersuchungen in den einzelnen Zelllinien vorgenommen. Der Knockdown wurde immer per Western Blot oder qRT-PCR dargestellt.

4.2 Vorauswahl der richtigen shRNA-Sequenz

Um untersuchen zu können, welche Auswirkungen ein Knockdown von ZNF423 auf verschiedene ALL-Zelllinien hat, musste ein Weg gefunden werden, diesen Knockdown zu bewerkstelligen. Zu diesem Zwecke wurde die RNA-Interferenz eingesetzt. Zur Auswahl standen 5 verschiedene shRNAs, die mit einem U6-Promoter in einem pLKO.1-Expressionsvektor eingebunden waren. Außerdem enthielt dieser Vektor eine tGFP-Kassette mit einem CMV-Promoter, sowie einer Puromycin- und eine Ampicillin-Resistenz. Um zu entscheiden, welcher dieser shRNA-Sequenzen die effizienteste Sequenz ist, wurden 293T-Zellen mit einem ZNF423 α -Überexpressionsplasmid mit FLAG-Tag sowie mit den verschiedenen shRNAs transfiziert. Als Kontrolle wurden der pLKO.1-YFP-empty Vektor (*Leervektor*), sowie der pLKO.1-YFP-shSCR Vektor (*Scrambled-Sequenz*) mitgeführt. Beide Kontroll-Sequenzen waren in ein pLKO.1-Expressionsplasmid mit einer YFP-Kassette (hPGK-Promoter) und einer Ampicillinresistenz kloniert worden. Zwei Tage nach Transfektion wurden sowohl Proteinanalysen mittels Western Blot sowie Expressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt; die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt. Das mRNA Expressionsniveau zeigt, dass *shZNF423-#62* eine Knockdown-Effizienz von 79 %, -*#63* von 83 %, -*#66* von 76 % und -*#74* von 69 % aufwiesen, während die *shZNF423-#64* (32 %) eine deutliche schwächere Expressionsminderung aufzeigte. Der Leervektor *empty* sowie die Scrambled-Sequenz *shSCR* bewirkten keinen Knockdown. Im Immunoblot zeigen die shRNA-Sequenzen *shZNF423-#62* sowie *shZNF423-#63* einen erfolgreichen Knockdown, erkennbar an einer stark reduzierten Signalintensität. Auch die shRNA-Sequenzen *shZNF423-#64*, *shZNF423-#66* und *shZNF423-#74* zeigten im Vergleich zum Leervektor und zur Scrambled-Sequenz ein abgeschwächtes Proteinsignal. Der Knockdown war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei *shZNF423-#62* und *shZNF423-#63*. Da sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene die Sequenzen *shZNF423-#62* und *shZNF423-#63* die besten Ergebnisse gezeigt haben, wurden diese für die weiteren Versuche eingesetzt.

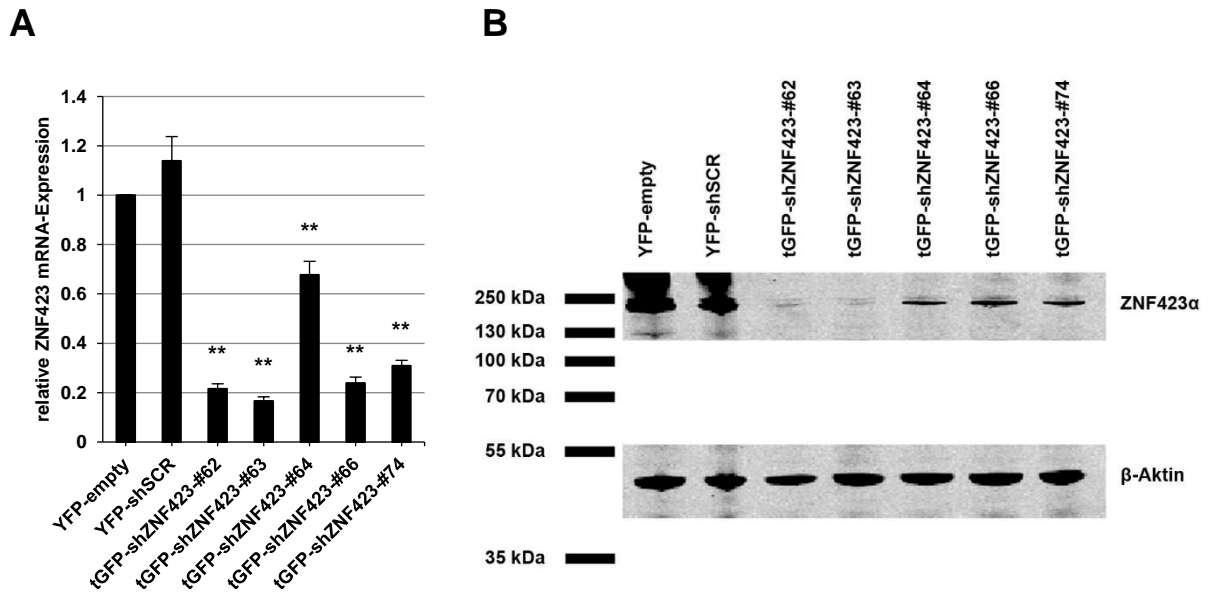


Abbildung 7: Untersuchung der Knockdown-Effizienz durch Transfektion verschiedener shRNAs

293T-Zellen wurden sowohl mit einem ZNF423 α -Überexpressionsplasmid mit FLAG-Tag als auch mit verschiedenen shRNAs transfiziert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit einem Leervektor (*YFP-empty*) und ein Ansatz mit einer Scrambled-Sequenz (*YFP-shSCR*) transfiziert. Nach 2 Tagen wurden (A) aus den Zellen cDNA gewonnen und diese für eine Quantifizierung von *ZNF423* und *B2M* mittels qRT-PCR verwendet. Die Messung fand im technischen Triplikat statt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. (B) Ein Teil der Zellen wurde in Laemmli-Puffer lysiert und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Auf einem Western Blot wurden die Proteine mittels *anti-FLAG* und *anti- β -Aktin*-Antikörpern sowie fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern auf einem *LI-COR Odyssey Imager* detektiert. Die Transfektionsrate wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug zwischen 92% und 99%. Die Ergebnisse wurden mehrfach unabhängig voneinander reproduziert (n=4). Die Signifikanzen wurden mittels Welch's T-Test berechnet und beziehen sich im Vergleich zum Kontrollvektor *YFP-shSCR* (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; n. s. nicht signifikant).

4.3 Etablierung eines Vektorsystems für die shRNA-Sequenz

Transduktionen der ALL-Zelllinie REH mit lentiviralen Partikeln, die die Vektoren *pLKO.1-tGFP-shZNF423-#62* / *pLKO.1-tGFP-shZNF423-#63* / *pLKO.1-YFP-shSCR* / *pLKO.1-YFP-empty* enthielten, haben gezeigt, dass weit weniger tGFP als YFP exprimiert wurde. Die durchflusszytometrisch bestimmten Transduktionseffizienzen betragen bei den shZNF423-Sequenzen $\leq 20\%$, während die Transduktionseffizienzen der YFP-Vektoren $\geq 80\%$ betragen (*Daten nicht gezeigt*). Eine naheliegende Erklärung für die unterschiedliche Effizienz in der Reporterexpression waren die verschiedenen Promotoren der Reportergene. Die tGFP-Vektoren enthielten einen CMV (*Zytomegalievirus*)-Promoter, die YFP-Vektoren einen hPGK (*humane Phosphoglyceratkinase*)-Promoter. Der CMV-Promoter leitet sich vom humanen Zytomegalievirus ab, einem Vertreter aus der Gruppe der Herpes-Viren⁶⁵. Dieser ist einer der stärksten Promotoren und eignet sich für verschiedenste Vektorsysteme⁶⁵. In der Literatur ist jedoch beschrieben, dass der CMV (*Zytomegalievirus*)-Promoter reprimiert werden kann⁶⁶. Da die Transduktionseffizienz

durchflusszytometrisch anhand von Fluoreszenzproteinen geprüft wurde, war es von Bedeutung, ein verlässliches Vektorsystem zu erstellen. Um außerdem die Kontrollvektoren und die shZNF423-Expressionsplasmide vergleichbarer zu machen, wurden die Sequenzen aus dem pLKO.1-tGFP-puro-Vektor in den pLKO.1-YFP Vektor durch gerichtete Mutagenese kloniert (s. Abb. 8). Der neue Vektor enthielt jetzt an Stelle des Fluoreszenzproteins tGFP das YFP mit dem hPGK-Promoter. Dieser Promoter gehört zur konstitutiv exprimierten Phosphoglyceratkinase und zeigt eine moderate Aktivität⁶⁷. Die shRNA-Sequenzen wurden weiterhin unter dem U6-Promoter transkribiert und die Plasmidgröße verringerte sich von 8405 bp auf 7155 bp.

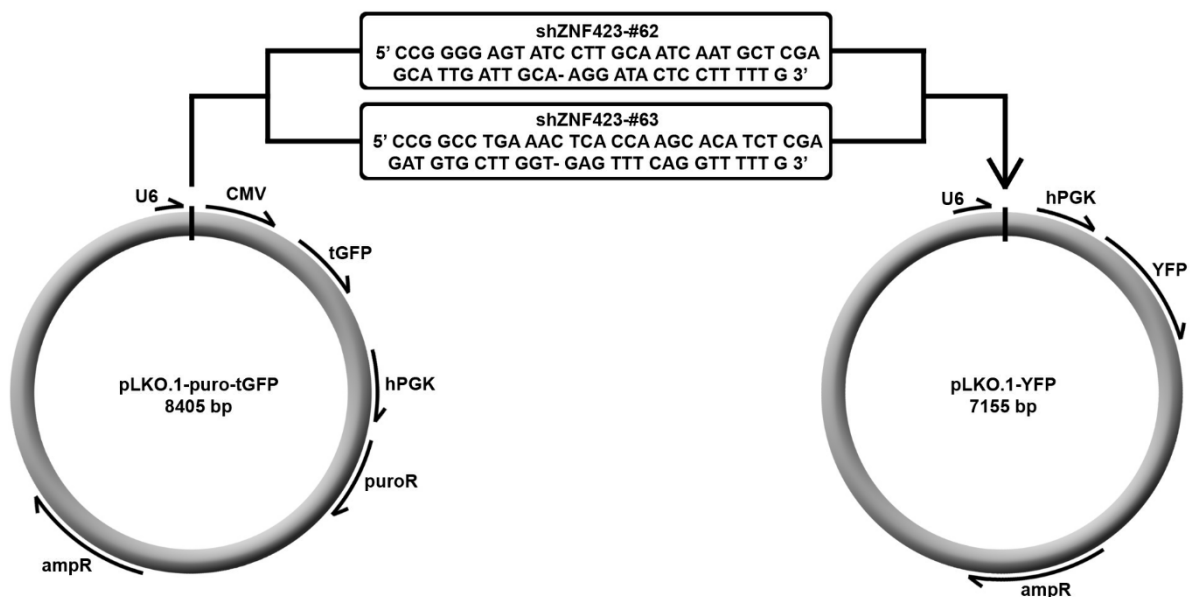


Abbildung 8: Klonierung der shRNA-Sequenz in einen neuen Vektor

Die shRNA-Sequenzen *shZNF423-#62* und *shZNF423-#63* wurden vom *pLKO.1-puro-tGFP*-Vektor in den *pLKO.1-YFP*-Vektor kloniert. Hierzu wurde die Ligation-During-Amplification-Methode angewandt. Als Template diente das *pLKO.1-YFP-empty*-Plasmid, welches mit dem *pLKO.1-YFP-scr*-Plasmid identisch war, jedoch keine shRNA-Sequenz enthielt. Die genutzten Primer sind in Tabelle 13 aufgelistet. Nach der Amplifikation wurden die Ansätze mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, anschließend in *XL10-Gold* ultrakompetenten *E. Coli*-Bakterien transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen. Nach 16 Stunden Inkubation wurden von beiden shRNA-Sequenzen je 12 Klone ausgepickt, über Nacht inkubiert und anschließend eine Plasmidextraktion vorgenommen.

Aus den je 12 Klonierungsansätzen pro shRNA-Sequenz wurden nach Sequenzierung jeweils 2 ausgewählt, um zu prüfen, ob diese weiterhin einen Knockdown ausüben. Hierfür wurden 293T-Zellen mit einem ZNF423 α -Überexpressionsplasmid sowie den *YFP-shZNF423-#62-(1/2)* / *YFP-shZNF423-#63-(1/2)* / *YFP-shSCR* / *YFP-empty* - Vektoren transfiziert. Die Klonierung erwies sich als erfolgreich, da auch diesmal bei jedem Vektor im Vergleich zu den Kontrollen ein Knockdown auf Proteinebene dargestellt werden konnte (s. Abb. 9). Das Expressionsplasmid *YFP-shZNF423-#62-1*

zeigte die geringste Signalintensität im Immunoblot und wurde für weitere Versuche verwendet.

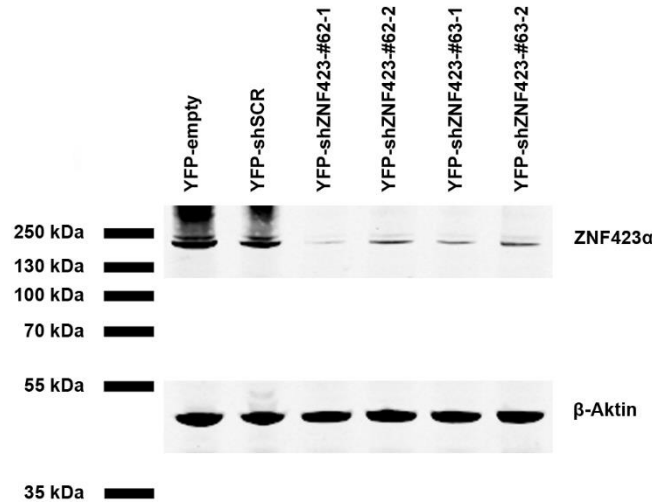


Abbildung 9: Untersuchung der Knockdown-Effizienz durch Transfektion der pLKO.1-YFP-Plasmide

293T-Zellen wurden sowohl mit einem ZNF423 α -Überexpressionsplasmid mit FLAG-Tag als auch mit den durch gerichtete Mutagenese erstellten Plasmiden transfiziert. Von jeder shRNA-Sequenz wurden nach der Sequenzierung 2 unterschiedliche Subklone verwendet. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit einem Leervektor (*YFP-empty*) und ein Ansatz mit einer Scrambled-Sequenz (*YFP-shSCR*) transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Auf einem Western Blot wurden die Proteine mittels *anti-FLAG* und *anti- β -Aktin*-Antikörpern sowie fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern auf einem *LI-COR Odyssey Imager* detektiert. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert.

4.4 Reporterstudie und Transduktion von 697*-Zellen

Um festzustellen, ob der Knockdown von ZNF423 funktionelle Folgen für die Zelle hat, wurde eine Reporterstudie durchgeführt. Harder et al. konnten zeigen, dass eine ZNF423 α -Überexpression eine Verringerung der CD79b-Promoteraktivität bewirkt⁴⁴. Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden. Durch Überexpression von ZNF423 α wurde die CD79b-Promoteraktivität um ca. zwei Drittel gesenkt. Ein Knockdown von ZNF423 α zeigte eine Erholung der CD79b-Promoteraktivität auf ca. die Hälfte. Es konnte jedoch nicht das Niveau vor ZNF423 α -Überexpression erreicht werden (s. Abb. 10). Auf Transkript-Ebene konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von ZNF423 bei Überexpression ca. 8-mal höher war als ohne Überexpression. Durch den Knockdown konnte dieses Niveau auf das 1,34-fache des Ausgangswertes gesenkt werden.

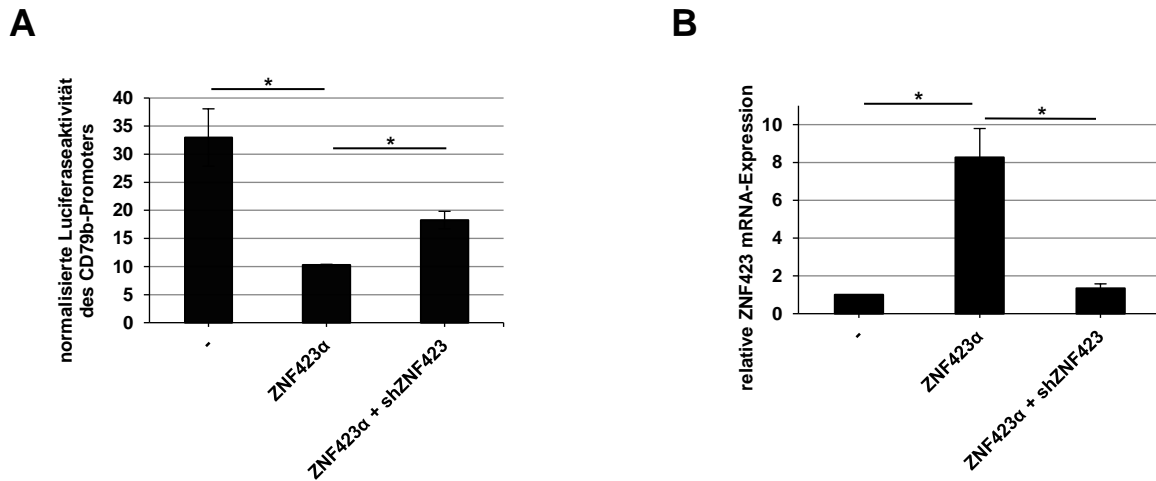


Abbildung 10: CD79b-Promoteraktivität unter ZNF423-Knockdown

(A) Reportergenstudie mit 293T-Zellen. Die Zellen wurden an Tag 1 mit dem *pGL3-CD79b-Promoter* transfiziert. An Tag 2 folgte die Transfektion mit *ZNF423 α* alleine sowie *ZNF423 α + shZNF423*. Die Messung fand an Tag 4 im technischen Triplikate statt, die Luciferase-Aktivität ist auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Als Positivkontrolle wurde ein konstitutiv aktiver Promoter (*pGL3-control*) mitgeführt, als Negativkontrolle ein Leervektor (*pGL3-basic*) (nicht in der Abb.) (B) Ein Teil der Zellen wurden an Tag 4 entnommen, aus ihnen wurde cDNA gewonnen und mittels einer qRT-PCR *ZNF423* und *B2M* quantifiziert. Die Messung fand im technischen Triplikate statt, die Werte sind auf den Ansatz ohne die *ZNF423 α* -Überexpression normalisiert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Die Signifikanzen wurden mittels Welch's T-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. nicht signifikant).

Abbildung 11 zeigt die Transduktion von 697*-Zellen durch lentivirale Partikel, die die Expressionsplasmide *YFP-empty*, *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten. Die Transduktionseffizienz wurde ab dem vierten Tag nach Transduktion durchflusszytometrisch verfolgt, betrug $\geq 95\%$ und hielt sich über 5 Tage stabil. Die Prozentzahl der vitalen Zellen innerhalb der Zellsuspension wurde ebenfalls am FACS untersucht. Es hat sich gezeigt, dass bei den Zellen mit dem Leervektor *YFP-empty* der Anteil der vitalen Zellen innerhalb von 5 Tagen um 39% zunahm, bei den Zellen mit dem Kontrollvektor *YFP-shSCR* zeigte sich eine Zunahme um 17%. Bei den Knockdown-Zellen hingegen zeigte sich eine Abnahme um 41%, sodass an Tag 8 nach Transduktion nur noch 59% der Zellen als vital charakterisiert werden konnten. Abbildung 11 (C) zeigt, dass an allen 5 Untersuchungstagen ein stabiler Knockdown mit einer Effizienz von 62% - 87% herrschte, während die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid *YFP-shSCR* transduziert waren, ähnliche oder höhere Level *ZNF423* transkribierten als die Leervektorkontrolle *YFP-empty*.

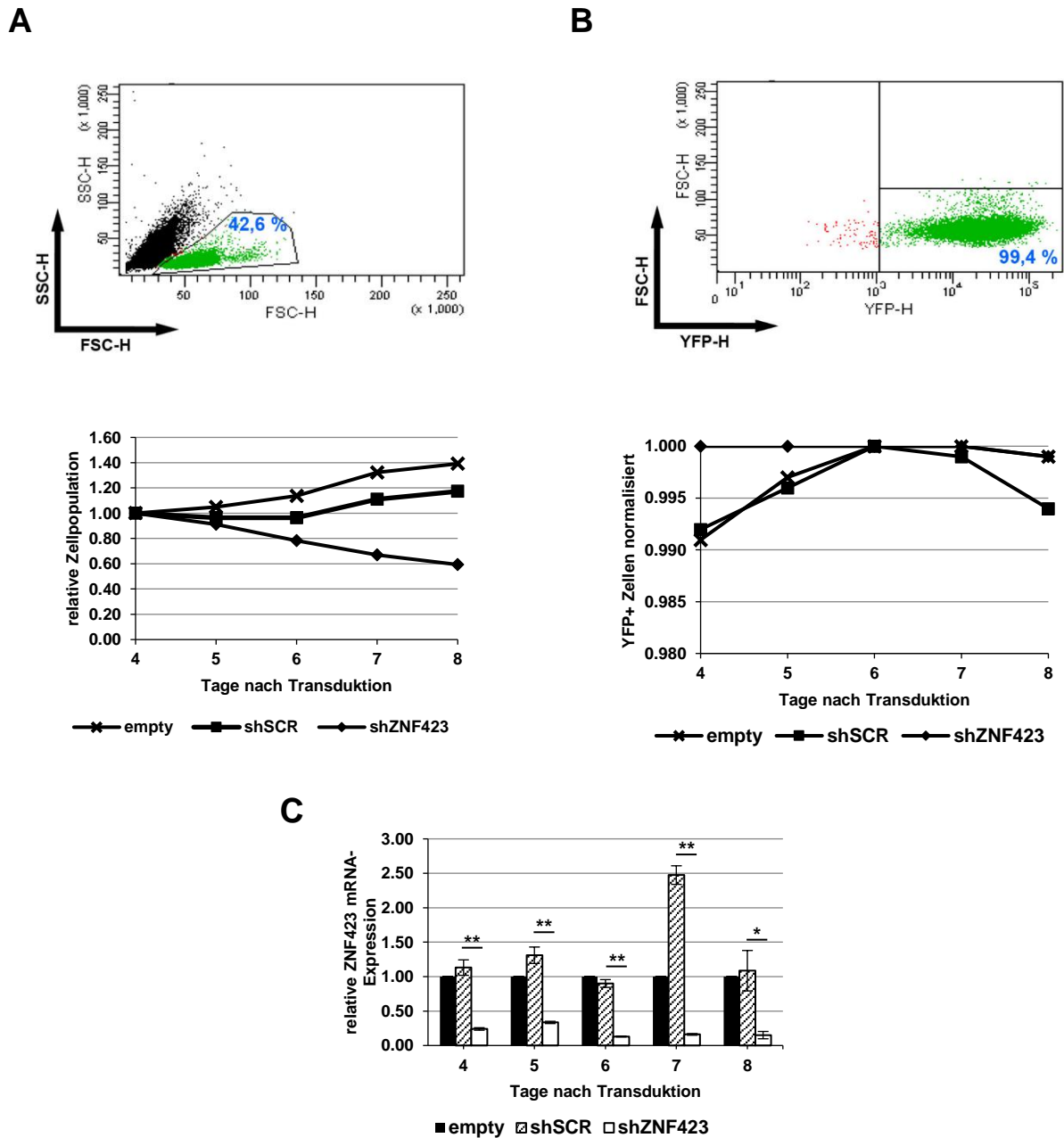


Abbildung 11: Untersuchung der Transduktionseffizienz und Zellpopulation nach ZNF423-Knockdown in 697*-Zellen

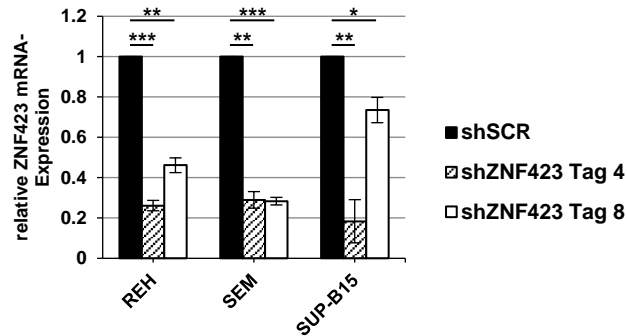
697*-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die die Plasmide *YFP-empty*, *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 450 μ l DPBS vermischt und 1 Minute am *BD FACS Canto* bei mittlerer Flussgeschwindigkeit (72 μ l / Minute) analysiert. Anhand von *Forward Scatter* und *Side Scatter* wurde ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen beinhaltet. (A) Der Anteil der Zellen in diesem Gate im Verhältnis zu allen Zellen, die Messungen sind auf den ersten Messtag normalisiert. Der FACS Plot zeigt exemplarisch die Daten des Knockdowns *shZNF423* an Tag 8 (*vollständige Daten im Anhang*) (B) Der Anteil YFP-positiver Zellen in diesem Gate wurde untersucht, die Messungen sind auf den Tag mit der höchsten Transduktionseffizienz normalisiert. Der FACS Plot zeigt exemplarisch die Daten des Knockdowns *shZNF423* an Tag 8 (*vollständige Daten im Anhang*) (C) Außerdem wurden von Tag 4 bis Tag 8 Zellen entnommen und aus ihnen cDNA gewonnen. Die relative Quantifizierung von *ZNF423* und *B2M* wurde per qRT-PCR durchgeführt, die Messungen fanden im technischen Triplikat statt und sind auf den Leervektor *YFP-empty* normalisiert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert. Die Signifikanzen wurden mittels Welch's T-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. nicht signifikant).

4.5 ZNF423 Knockdown in verschiedenen ALL-Zelllinien

Da die Vorversuche in 293T-Zellen sowie in 697*-Zellen zeigten, dass ein Knockdown von ZNF423 durch YFP-shZNF423-#62 sowohl möglich war als auch funktionelle Folgen hatte, wurden die drei ALL-Zelllinien REH, SEM und SUP-B15 für weitere Analysen mit lentiviralen Partikeln transduziert, die entweder das Kontrollplasmid *YFP-shSCR* oder das *YFP-shZNF423-#62*-Plasmid enthielten. Die Zelllinie REH ist eine humane B-Zell-Vorläufer-Leukämie, welche die t(12;21)-Translokation trägt und somit das Fusionsgen ETV6-RUNX1 exprimiert. SEM-Zellen sind ebenfalls eine B-Zell-Vorläufer-Leukämie und tragen die Translokation t(4;11), welche das Fusionsgen MLL-AF4 exprimiert. Die B-Zell-Vorläufer-Leukämie SUP-B15 exprimiert hingegen die ALL-Variante (*m-BCR*) des Fusionsproteins BCR-ABL1. Um zu kontrollieren, ob der Knockdown auch in diesen Zellen erfolgreich war, wurden an Tag 4 nach Transduktion Zellkernlysate sowohl von den transduzierten Zellen als auch von Wildtyp-Zellen hergestellt und auf ZNF423 hin überprüft. Abbildung 12 zeigt den Western Blot zu dieser Analyse. Es zeigte sich, dass REH Wildtyp-Zellen kein ZNF423 exprimierten. Dementsprechend fand sich weder bei den Knockdown-Zellen dieser Zelllinie noch bei den Kontrollzellen ein Proteinsignal. Im Gegensatz hierzu exprimieren SEM-Zellen ZNF423. Bei dieser Zelllinie zeigte sich im Immunoblot sowohl bei den Wildtyp-Zellen als auch bei den Kontrollzellen (*YFP-shSCR*) ein Proteinsignal, welches bei den Knockdown-Zellen nicht produzierbar war. Gleiches gilt für die SUP-B15-Zellen, die sowohl im Wildtyp als auch bei den Kontrollzellen ein deutliches Proteinsignal zeigte, jedoch nicht bei den Knockdown-Zellen. Dieses Ergebnis konnte auch auf Transkriptionsebene reproduziert werden. Hierfür wurden an Tag 4 und Tag 8 nach Transduktion Zellen für eine qRT-PCR entnommen. In REH Zellen zeigte sich an Tag 4 nach Transduktion eine Transkriptionsminderung von ZNF423 um 74 %. Ein Knockdown blieb erhalten, an Tag 8 nach Transduktion zeigte sich eine Effizienz von 54 %. Bei den SEM-Zellen betrug die Transkriptionsminderung an Tag 4 71 %, der stabil blieb und an Tag 8 72 % betrug. In den SUP-B15 Zellen zeigte sich an Tag 4 nach Transduktion eine Repression der ZNF423-Transkription um 82 %, dieser Effekt hielt sich jedoch nicht über die Zeit und verringerte sich an Tag 8 nach Transduktion auf 27 % Knockdown-Effizienz. Es zeigte sich, dass REH-Zellen kein durch Western Blot nachweisbares ZNF423 exprimieren, jedoch auf transkriptioneller Ebene ein Knockdown nachgewiesen werden konnte. Die ZNF423-Transkription war bei den Wildtyp-Zellen entsprechend der Western Blot Ergebnisse sehr gering (*Daten nicht*

gezeigt). Bei den SEM-Zellen konnte man sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene einen effizienten Knockdown feststellen, der über 8 Tage stabil blieb, während man bei den SUP-B15-Zellen einen Knockdown erreichen konnte, dieser aber auf Dauer nicht stabil war.

A



B

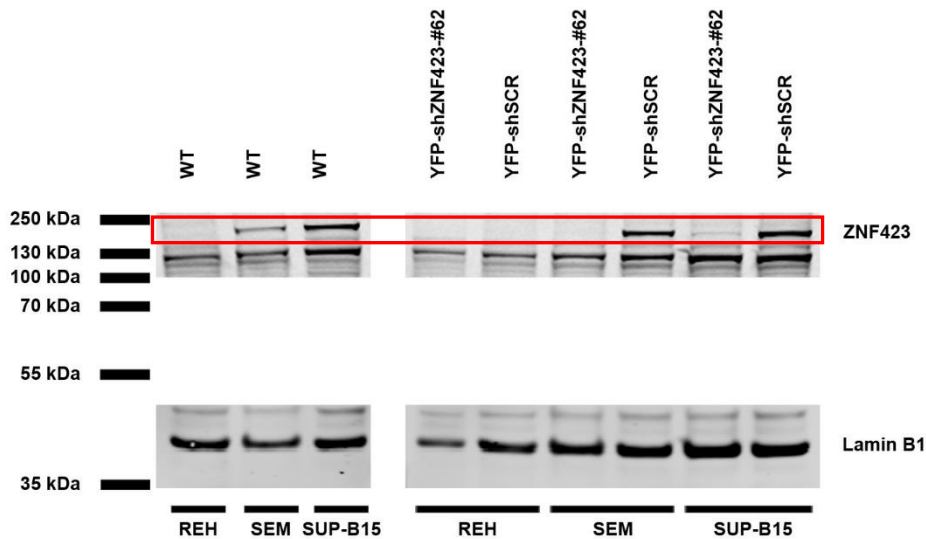


Abbildung 12: ZNF423 Knockdown durch Transduktion in verschiedenen ALL-Zelllinien

Es wurden lentivirale Partikel, welche die Plasmide *YFP-shZNF423-#62* und *YFP-shSCR* enthielten, hergestellt und die ALL-Zelllinien REH, SEM und SUP-B15 damit transduziert. (A) Sowohl an Tag 4 als auch an Tag 8 nach Transduktion wurde ein Teil der transduzierten Zellen entnommen, aus ihnen cDNA gewonnen und *ZNF423* und *B2M* wurden mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Messungen fanden im technischen Triplikate statt und sind auf den Kontrollvektor *shSCR* normalisiert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. (B) Außerdem wurden an Tag 4 nach der Transduktion aus jeweils 5×10^6 Zellen der transduzierten Zellpopulationen sowie von den Wildtyp-Zellen Zellkernlysate hergestellt. 20 μ g dieser Lysate wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *anti-ZNF423* und *anti-Lamin B1* sowie fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern auf einem Western Blot durch den *LI-COR Odyssey Imager* detektiert. Die Ergebnisse wurden mehrfach unabhängig voneinander reproduziert (n=3). Die Signifikanzen wurden mittels Welch's T-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. nicht signifikant).

4.6 Transduktionseffizienz und Veränderungen in der Zellpopulation unter Knockdown-Bedingungen

Um zu überprüfen, ob die Transduktion der ALL-Zelllinien mittels lentiviraler Partikel erfolgreich und stabil war und ob ein Knockdown einen Einfluss auf das Überleben und das Wachstum der Zellpopulation hat, wurden die Zellen nach Transduktion 8 Tage lang durchflusszytometrisch verfolgt. Hierbei wurde anhand von *Forward Scatter* und *Side Scatter* ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen enthielt. Abbildung 13 (A) zeigt dies exemplarisch. Anschließend wurde der Anteil der Zellen, die das Fluoreszenzprotein YFP exprimierten, in diesem Gate gemessen sowie das Verhältnis der vitalen Zellen zu allen Events im FACS bestimmt.

4.6.1 REH-Zelllinie (ETV6-RUNX1)

Abbildung 13 (B) zeigt die Daten zu den REH Zellen. Es zeigte sich, dass die Transduktion über 8 Tage stabil blieb. Bei der *shZNF423* erreichte die Transduktionseffizienz am zweiten Tag ihr Maximum und hatte am achten Tag nach Transduktion eine Effizienz von 97 % des Maximums. Die Transduktionseffizienzen betragen hier zwischen 92 % - 98 % (s. *Anhang*). Bei der Kontrolle *shSCR* zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Hier wurde das Maximum am dritten Tag nach Transduktion erreicht und an Tag 8 waren 95 % der Zellen genau so positiv wie an Tag 3. Die Transduktionseffizienzen betragen hier zwischen 85 % - 96 % (s. *Anhang*).

Der Anteil der vitalen Zellen unter Knockdown-Bedingungen stieg und hielt sich anschließend stabil, sodass sich an Tag 8 nach Transduktion im Vergleich zu Tag 1 30 % mehr Zellen in dem Gate für vitale Zellen befanden. Bei den Kontrollzellen *shSCR* schwankte dieser Anteil über acht Tage. Zuerst fand sich eine Erhöhung um 24 %, anschließend folgte eine Abnahme, sodass an Tag 8 99 % der Zellen, die an Tag 1 vital waren, weiterhin als vital gezählt werden können.

4.6.2 SEM-Zelllinie (MLL-AF4)

Abbildung 13 (C) zeigt die Daten zu den SEM-Zellen. Hier zeigte sich, dass sich die Transduktionseffizienzen sowohl der Kontrollzellen *shSCR* als auch der Knockdown-Zellen *shZNF423* gleich verhielten. Das Maximum wurde an Tag 2 nach Transduktion erreicht und nahm dann stetig ab. An Tag 8 nach Transduktion waren 43 % (*shSCR*) / 39 % (*shZNF423*) der Zellen, die an Tag 2 YFP-positiv waren, noch positiv. Die Transduktionseffizienzen variierten zwischen 34 % - 98 % (s. *Anhang*).

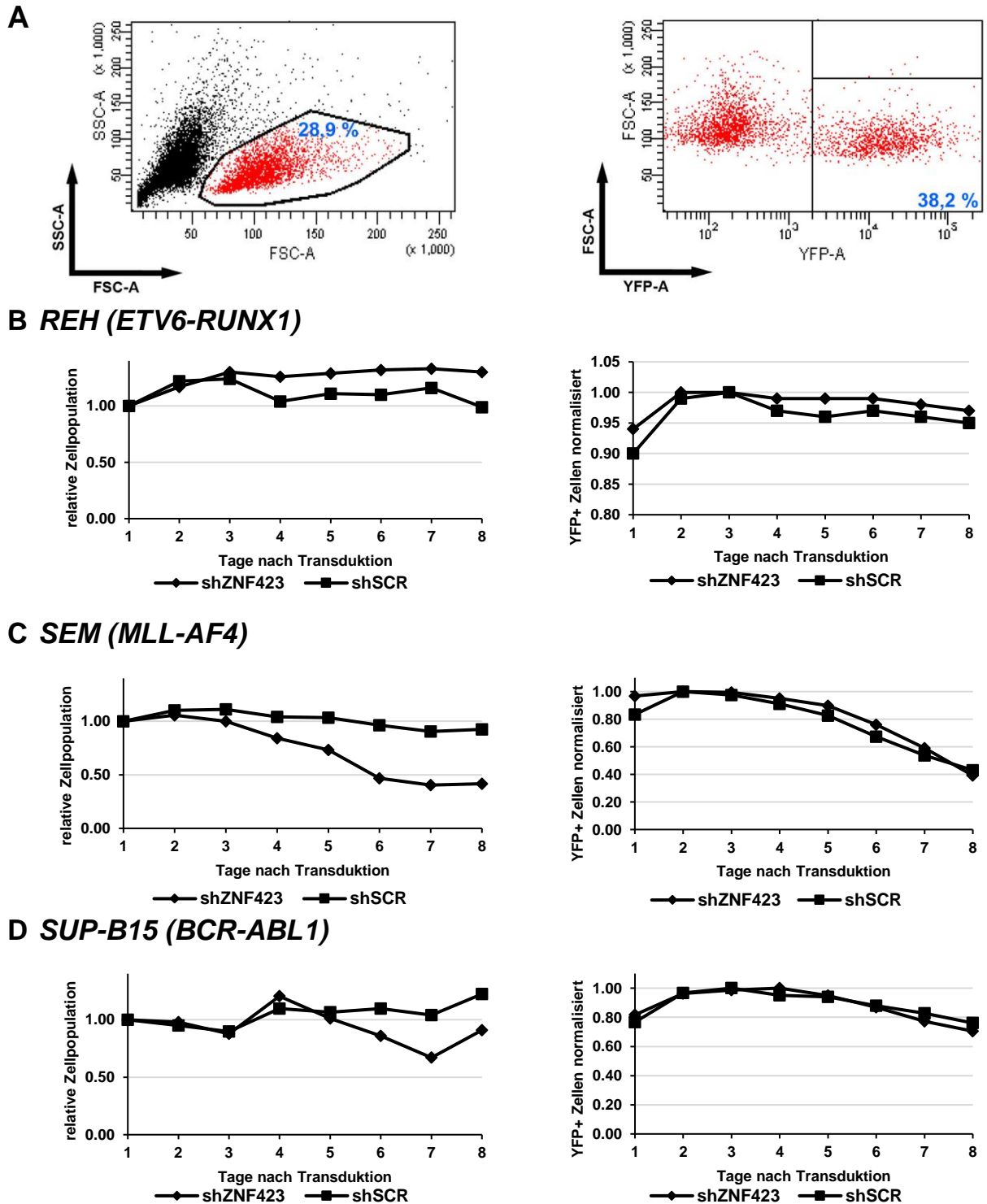


Abbildung 13: Untersuchung der Zellpopulation und Transduktionseffizienz nach ZNF423-Knockdown in verschiedenen ALL-Zelllinien

Es wurden lentivirale Partikel hergestellt, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten. Damit wurden verschiedene ALL-Zelllinien ((B) REH, (C) SEM, (D) SUP-B15) transduziert und 8 Tage lang durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 450 μ l DPBS vermischt und am *BD FACS Canto* analysiert. Anhand von *Forward Scatter* und *Side Scatter* wurde ein Gate gesetzt, welches die vitale Zellpopulation darstellt. (A) zeigt die FACS Plots exemplarisch für die SEM-Zellen mit ZNF423 Knockdown an Tag 8 (vollständige Daten im Anhang). (B, C, D) Die rechten Kurven zeigen die Veränderungen des Anteils YFP-positiver Zellen in diesem Gate, die Messungen wurden auf den Tag mit der höchsten Transduktionseffizienz normalisiert. Die linken Kurven zeigen den Anteil der Zellen in diesem Gate im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Die Messungen wurden auf den ersten Tag normalisiert. Die Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens einmal reproduziert.

Beim Verhalten der Zellpopulationen hinsichtlich des Anteils der vitalen Zellen konnte gezeigt werden, dass bei den Kontrollzellen *shSCR* der Anteil der vitalen Zellen innerhalb der Zellpopulation keinen starken Schwankungen unterlegen war. An Tag 8 nach Transduktion waren im Vergleich zu Tag 1 92 % der Zellen vital. Bei der Knockdown-Population *shZNF423* verhielt sich die Zellpopulation anders. Hier zeigte sich eine stetige Abnahme des Anteils vitaler Zellen, sodass an Tag 8 nach Transduktion 42% der Zellen für vital erklärt werden konnte.

4.6.3 SUP B15-Zelllinie (BCR-ABL1)

Abbildung 13 (D) zeigt die Daten für die SUP-B15-Zellen. Die SUP-B15-Zellen zeigten insgesamt eine schwächere Transduktionseffizienz; sie variierte zwischen 50 % - 83 % (s. *Anhang*). Die Kontrollzellen *shSCR* und die Knockdown-Zellen *shZNF423* zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Stabilität der Transduktionseffizienz. Das Maximum wurde an Tag 3 (*shSCR*) bzw. an Tag 4 (*shZNF423*) erreicht und an Tag 8 nach Transduktion waren 76 % (*shSCR*) bzw. 70 % (*shZNF423*) YFP-positiv.

Bei der Veränderung der Zellpopulation zeigte sich, dass die Kontrollgruppe *shSCR* nach 8 Tagen im Vergleich zu Tag 1 insgesamt 22 % mehr vitale Zellen hatte und über die Zeit auch keine größeren Schwankungen einsetzten. Bei den Knockdown-Zellen *shZNF423* gab es starke Schwankungen vom 0,67 bis 1,2 -fachen des Wertes von Tag 1. An Tag 8 waren letztlich im Vergleich zu Tag 1 91 % der Zellen weiterhin vital.

4.7 Untersuchung der Apoptose mittels Annexin V / PI Färbung

Um die Veränderungen der Zellpopulationen genauer zu analysieren, wurde zunächst die Apoptose untersucht. Mittels Färbung durch Annexin V und PI an Tag 4, Tag 6 und Tag 8 konnten früh-apoptotische (Annexin V⁺/PI⁻) sowie spät-apoptotische (Annexin V⁺/PI⁺) Zellen analysiert werden.

4.7.1 REH-Zelllinie (ETV6-RUNX1)

Abbildung 14 zeigt die Daten des Apoptose-Assays für die REH-Zellen. An Tag 4 waren in der Kontrollgruppe *shSCR* 23,3 % der Zellen früh-apoptotisch und 5,0 % spät-apoptotisch. 71,7 % der Zellen waren für beide Färbungen negativ. In der Knockdown-Gruppe *shZNF423* war dies ähnlich, 20,1 % frühapoptotisch, 5,4 % spätapoptotisch sowie 74,2 % für beide Färbungen negativ. Somit zeigte sich an Tag 4 nach Transduktion kein Unterschied in der Apoptose zwischen Knockdown und Kontrolle.

An Tag 6 zeigten sich ähnliche Werte. 19,8 % der Zellen in der Kontrolle *shSCR* befanden sich in der frühen Apoptose, 5,2 % in der späten Apoptose und 74,9 % waren

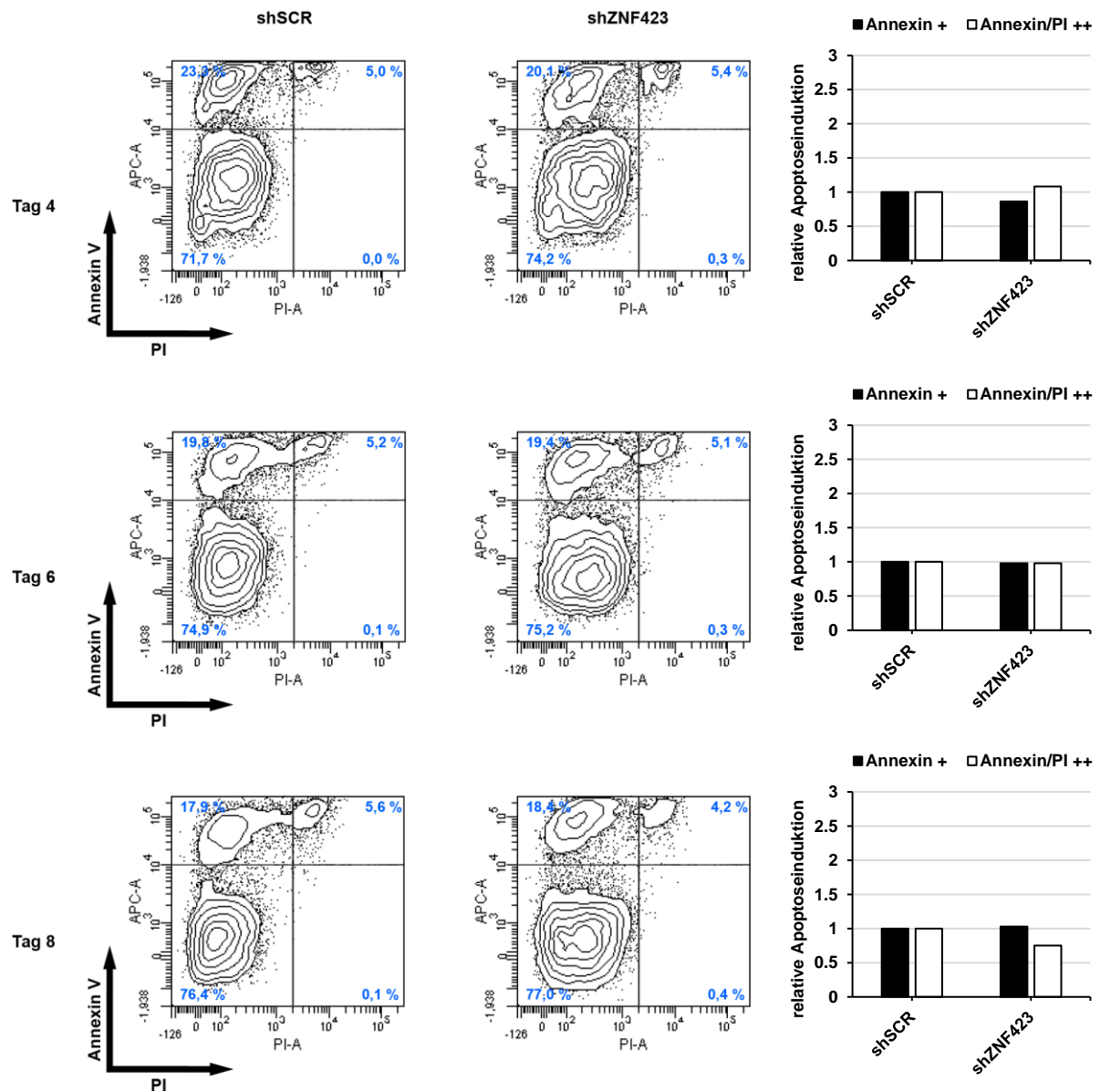


Abbildung 14: Untersuchung der Apoptose in REH-Zellen

Lentivirale Partikel, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, wurden hergestellt um damit die ALL-Zelllinie REH zu transduzieren. An Tag 4, 6 und 8 nach der Transduktion wurde mittels eines Annexin V / PI Assays die Apoptose durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden 50 μ l der Zellsuspension für 15 Minuten mit 5 μ l Annexin V-APC und 5 μ l PI gefärbt. Die FACS Plots zeigen im oberen linken Quadranten (Annexin⁺/PI⁻) die frühe Apoptose, im oberen rechten Quadranten (Annexin⁺/PI⁺) die späte Apoptose. Im Balkendiagramm wurde die frühe und späte Apoptose auf das Kontrollplasmid *shSCR* normalisiert. Die Ergebnisse wurden mehrfach unabhängig voneinander reproduziert (n=3).

doppelt-negativ. In der Knockdown-Population *shZNF423* waren 19,4 % in der frühen Apoptose, 5,1 % in der späten Apoptose und 75,2 % für beide Färbungen negativ. Auch an Tag 6 zeigte sich kein Unterschied in der Apoptose zwischen Kontrolle und Knockdown.

An Tag 8 waren 17,9 % der Zellen der Kontrolle in der frühen Apoptose, 5,8 % befanden sich in der späten Apoptose und 76,4 % waren vital. In der Knockdown-Population waren die Ergebnisse ähnlich und es befanden sich 18,4 % der Zellen in der frühen Apoptose, 4,2 % in der späten Apoptose und 77,0 % waren vital. An Tag 8 zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Knockdown.

4.7.2 SEM-Zelllinie (MLL-AF4)

Abbildung 15 zeigt die Daten des Apoptose-Assays für die SEM-Zellen. An Tag 4 zeigte die Kontrolle *shSCR* 9,9 % früh-apoptotische Zellen, 11,6 % spätapoptotische Zellen sowie 78 % vitale Zellen. Bei den Knockdown-Zellen *shZNF423* zeigten sich 13,7 % in der frühen sowie 25,7 % in der späten Apoptose. 59,6 % waren vital. Unter Knockdown-Bedingungen konnte man an Tag 4 eine Induktion der frühen Apoptose auf 138 % feststellen, die späte Apoptose war auf 220 % erhöht.

An Tag 6 setzte sich der Trend fort. Die Kontrolle *shSCR* hatte 10,2 % früh-apoptotische Zellen, 14,4 % spät-apoptotische Zellen sowie 74,4 % Zellen, die für beide Färbungen negativ waren. Bei den Knockdown-Zellen waren 23,3 % in der frühen Apoptose, 37,4 % in der späten Apoptose sowie 36,3 % vital. Hier zeigte sich unter den Knockdown-Bedingungen eine Erhöhung der frühen Apoptose auf 230 % sowie eine Induktion der späten Apoptose auf 260 %. Insgesamt waren unter Knockdown-Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle weniger als die Hälfte der Zellen vital.

An Tag 8 zeigte sich, dass die Kontrolle *shSCR* 9 % früh-apoptotische Zellen, 19,6 % spät-apoptotische Zellen sowie 69,7 % vitale Zellen hatte. Bei den Knockdown-Zellen *shZNF423* waren 21,1 % in der frühen Apoptose, 37,1 % in der späten Apoptose sowie 38,1 % vital. Auch an diesem Messtag zeigte sich, dass die Knockdown-Zellen eine höhere Apoptoseinduktion als die Kontrollzellen hatten. Die frühe Apoptose war auf 230 %, die späte auf 190 % erhöht.

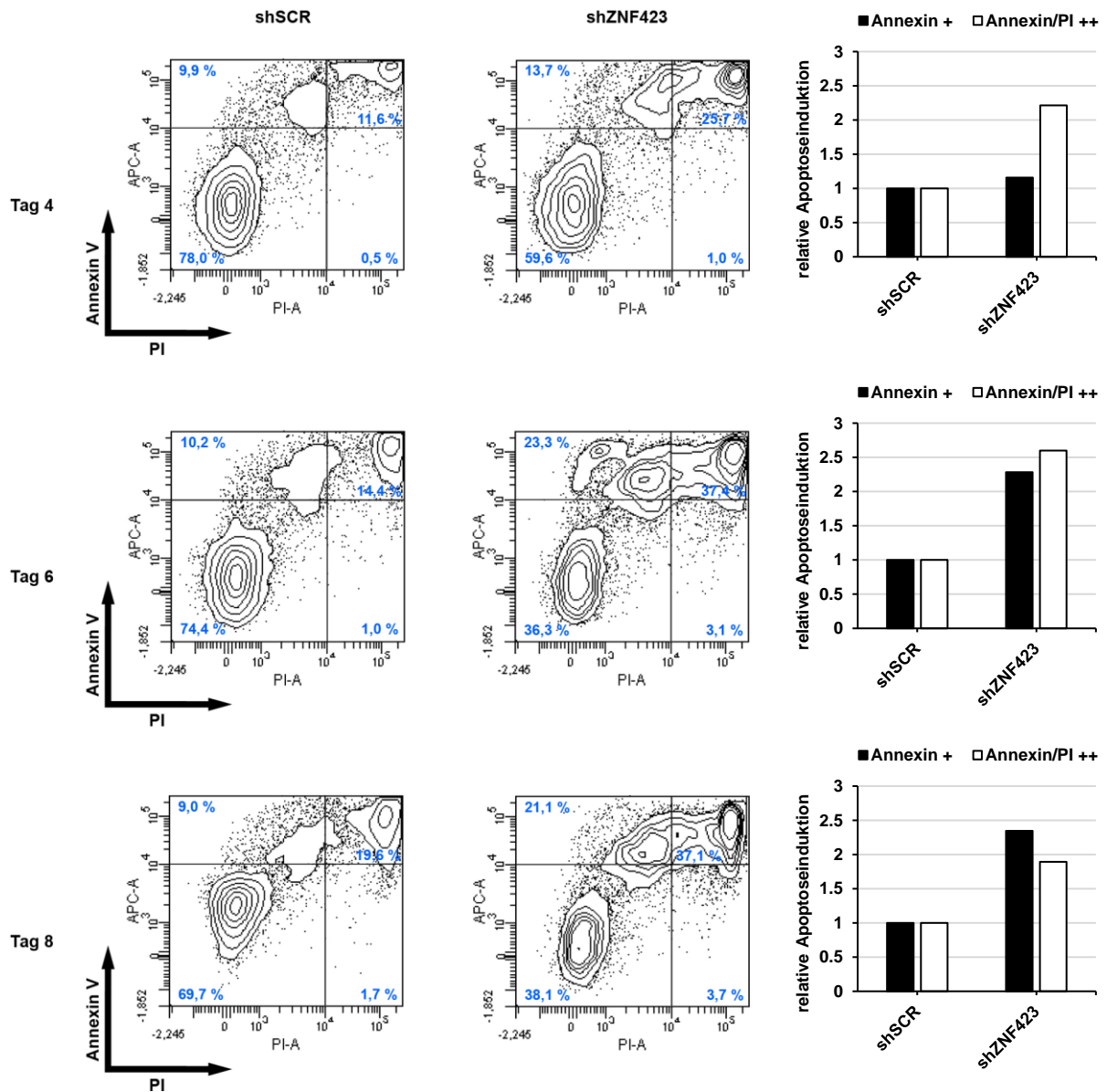


Abbildung 15: Untersuchung der Apoptose in SEM-Zellen

Lentivirale Partikel, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, wurden hergestellt um damit die ALL-Zelllinie SEM zu transduzieren. An Tag 4, 6 und 8 nach der Transduktion wurde mittels eines Annexin V / PI Assays die Apoptose durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension für 15 Minuten mit 5 µl Annexin V-APC und 5 µl PI gefärbt. Die FACS Plots zeigen im oberen linken Quadranten (Annexin⁺/PI⁻) die frühe Apoptose, im oberen rechten Quadranten (Annexin⁺/PI⁺) die späte Apoptose. Im Balkendiagramm wurde die frühe und späte Apoptose auf das Kontrollplasmid *shSCR* normalisiert. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert.

4.7.3 SUP-B15-Zelllinie (BCR-ABL1)

Abbildung 16 zeigt die Daten des Apoptose-Assays für die SUP-B15-Zellen. An Tag 4 zeigte die Kontrollgruppe 14,4 % der Zellen in der frühen und 16,9 % in der späten Apoptose. 66,9 % der Zellen waren vital.

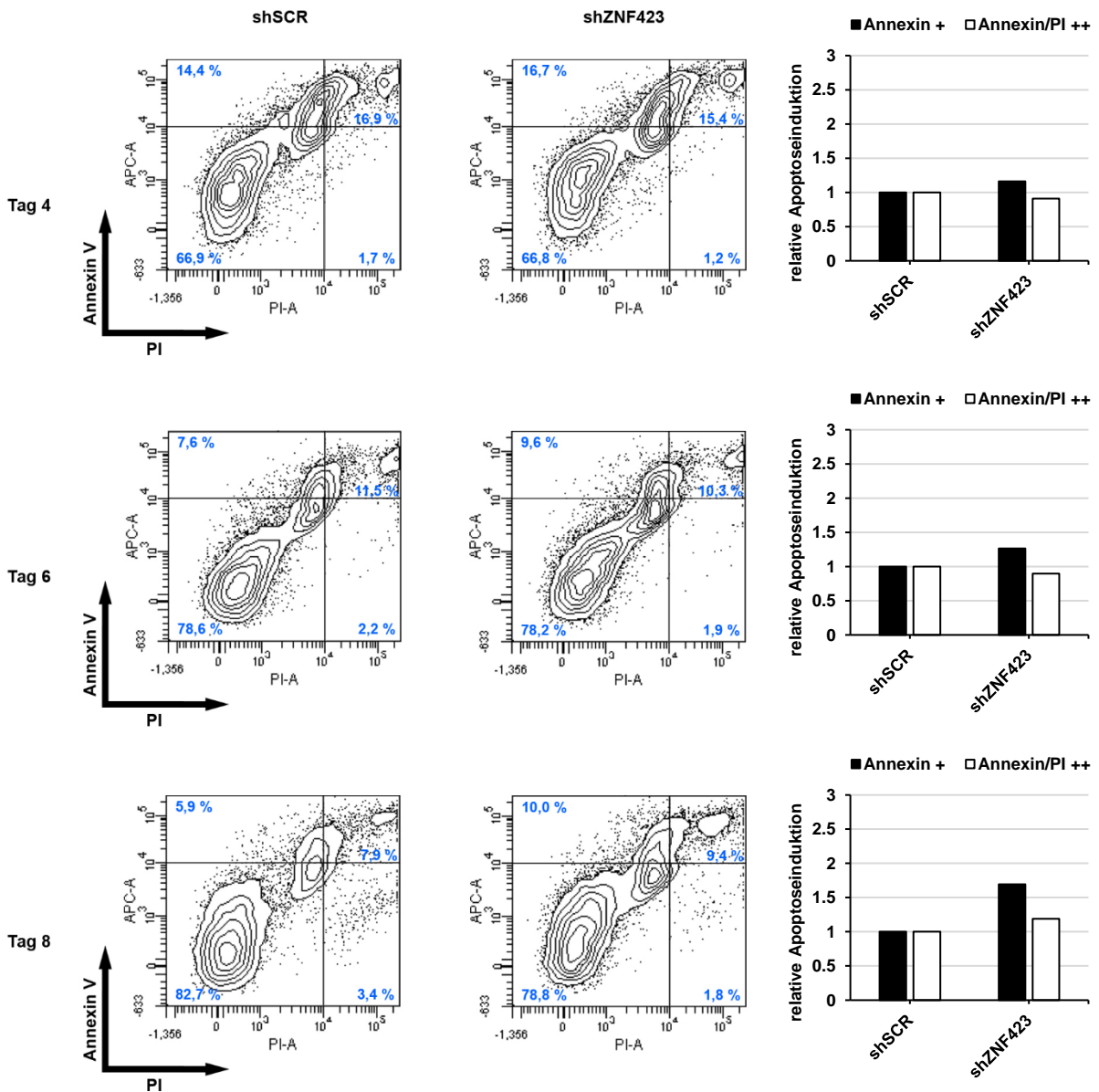


Abbildung 16: Untersuchung der Apoptose in SUP-B15-Zellen

Lentivirale Partikel, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, wurden hergestellt um damit die ALL-Zelllinie SUP-B15 zu transduzieren. An Tag 4, 6 und 8 nach der Transduktion wurde mittels eines Annexin V / PI Assays die Apoptose durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension für 15 Minuten mit 5µl Annexin V-APC und 5 µl PI gefärbt. Die FACS Plots zeigen im oberen linken Quadranten (Annexin+/PI-) die frühe Apoptose, im oberen rechten Quadranten (Annexin+/PI++) die späte Apoptose. Im Balkendiagramm wurde die frühe und späte Apoptose auf das Kontrollplasmid *shSCR* normalisiert. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert.

Die Knockdown-Zellen befanden sich zu 16,7 % in der frühen und zu 15,4 % in der späten Apoptose, 66,8 % waren für beide Färbungen negativ. Im Verhältnis zur Kontrolle waren unter Knockdown-Bedingungen eine Erhöhung auf 116 % in der frühen Apoptose sowie eine Minderung auf 90 % in der späten Apoptose feststellbar.

An Tag 6 waren in der Kontrollgruppe *shSCR* 7,6 % der Zellen spät-apoptotisch, 11,5 % früh-apoptotisch und 78,6 % vital. In der Knockdown-Gruppe *shZNF423* waren 9,6 % der Zellen früh-apoptotisch, 10,3 % spät-apoptotisch sowie 78,2 % vital. Hier zeigte sich eine erhöhte Induktion der frühen Apoptose auf 126 % in den Knockdown-Zellen, die späte Apoptose betrug im Vergleich 90 %.

An Tag 8 nach Transduktion waren 5,9 % der Kontrollzellen in der frühen sowie 7,9 % in der späten Apoptose, 82,7 % waren vital. In der Knockdown-Gruppe waren es 10 % in der frühen Apoptose, 9,4 % in der späten Apoptose sowie 78,8 % vitale Zellen. Im Verhältnis zeigte sich hier eine erhöhte Induktion der frühen Apoptose auf 170 % im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie eine erhöhte Induktion der späten Apoptose auf 120 %.

4.8 Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation

Um Unterschiede zwischen Knockdown und Kontrolle in der Proliferation feststellen zu können, wurde an Tag 7 nach Transduktion der Zellzyklus mittels BrdU-Inkorporation untersucht. Dies wurde für SEM und SUP-B15 Zellen durchgeführt.

4.8.1 SEM-Zelllinie (MLL-AF4)

Abbildung 17 zeigt die Daten des BrdU-Assays der SEM-Zellen. In den Kontrollzellen *shSCR* waren 9,6 % der Population apoptotisch. 47,2 % befanden sich in der G0/G1-Phase, 34,2 % in der S-Phase sowie 5,2 % in der G2/M-Phase. Bei den Knockdown-Zellen *shZNF423* waren 28,8 % apoptotisch, 46,8 % waren in der G0/G1-Phase, 16,4 % in der S-Phase sowie 3,6 % in der G2/M-Phase.

Verglich man den Anteil der Zellen in der S-Phase, zeigte sich, dass halb so viele Zellen unter Knockdown-Bedingungen in die S-Phase gingen als in der Kontrollgruppe *shSCR*.

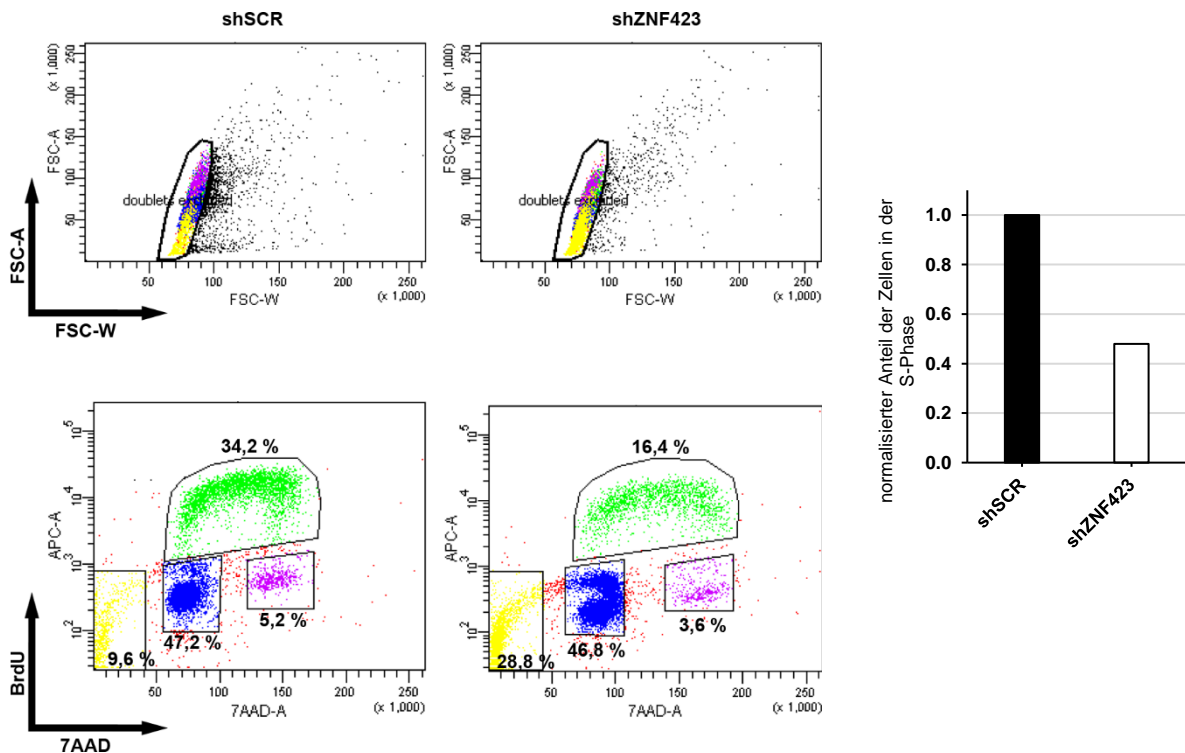


Abbildung 17: BrdU-Proliferationsassay in SEM-Zellen mit ZNF423-Knockdown

SEM-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und an Tag 7 mittels eines BrdU-Assays durchflusszytometrisch auf ihren Zellzyklus und speziell ihrer Proliferation untersucht. Hierfür wurden 300 μ l der Zellsuspension mit einer maximalen Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml für 40 Minuten mit *Bromdesoxyuridin* (*BrdU*) inkubiert. Die oberen FACS Plots zeigen die Zellpopulation, die zur Auswertung des Zellzykluses herangezogen wurden. Anhand von *FSC-A* und *FSC-W* wurden die doppelten Zellen aussortiert. Die unteren FACS Plots zeigen die einzelnen Phasen des Zellzyklus: G0/G1-Phase (blau), S-Phase (grün), G2/M-Phase (lila) sowie apoptotische Zellen (gelb). Das Balkendiagramm rechts zeigt den Anteil der Zellen in der S-Phase, normalisiert auf den Kontrollvektor *shSCR*. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert.

4.8.2 SUP-B15-Zelllinie (BCR-ABL1)

Abbildung 18 zeigt die Daten des BrdU-Assays der SUP-B15-Zellen. Hier zeigte sich bei den Kontrollzellen, dass 15,6 % apoptotisch waren, 32,6 % in der G0/G1-Phase, 40,4 % in der S-Phase sowie 9,6 % in der G2/M-Phase. Bei den Knockdown-Zellen waren 21,4 % apoptotisch, 30,4 % in der G0/G1-Phase, 32,2 % in der S-Phase sowie 12,4 % in der G2/M-Phase.

Im Vergleich zwischen Kontrolle *shSCR* und Knockdown *shZNF423* zeigte sich, dass beim Knockdown das 20 % weniger Zellen in die S-Phase eintritt.

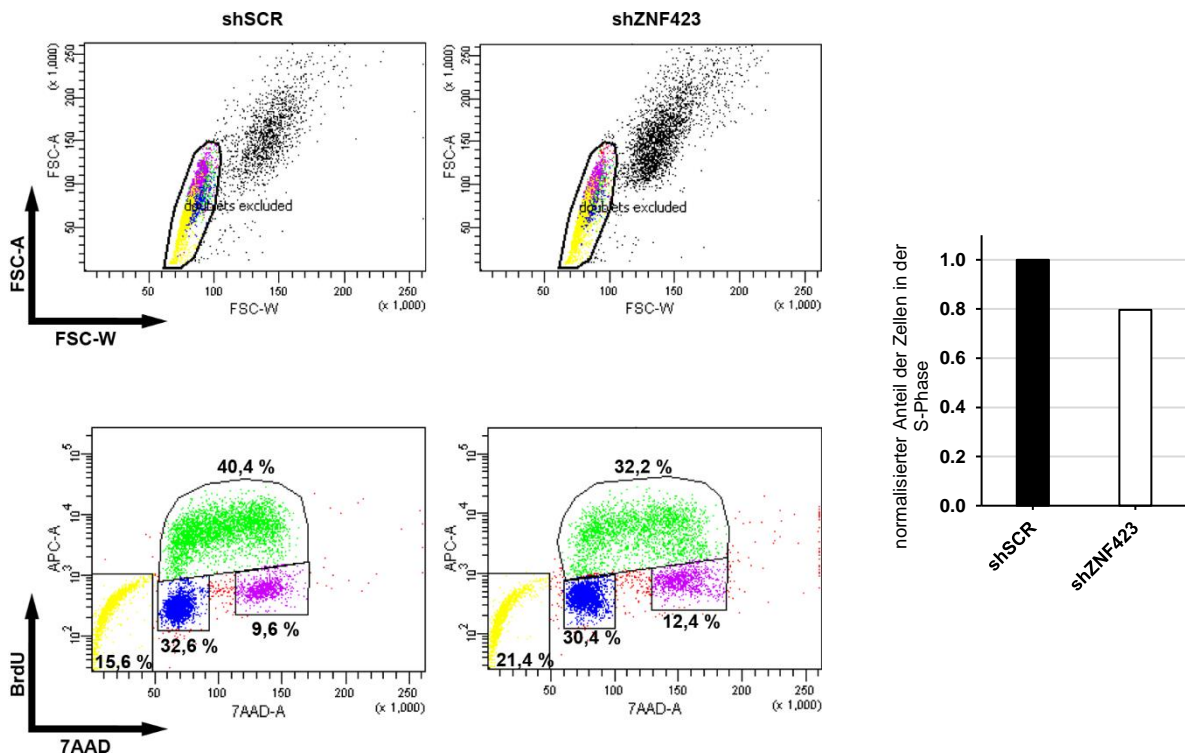


Abbildung 18: BrdU-Proliferationsassay in SUP-B15-Zellen mit ZNF423-Knockdown

SUP-B15-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und an Tag 7 mittels eines BrdU-Assays durchflusszytometrisch auf ihren Zellzyklus und speziell ihrer Proliferation untersucht. Hierfür wurden 300 μ l der Zellsuspension mit einer maximalen Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml für 40 Minuten mit *Bromdesoxyuridin* (*BrdU*) inkubiert. Die oberen FACS Plots zeigen die Zellpopulation, die zur Auswertung des Zellzykluses herangezogen wurden. Anhand von *FSC-A* und *FSC-W* wurden die doppelten Zellen aussortiert. Die unteren FACS Plots zeigen die einzelnen Phasen des Zellzyklus: G0/G1-Phase (blau), S-Phase (grün), G2/M-Phase (lila) sowie apoptotische Zellen (gelb). Das Balkendiagramm rechts zeigt den Anteil der Zellen in der S-Phase, normalisiert auf den Kontrollvektor *shSCR*. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander reproduziert.

5 Diskussion

5.1 Die shRNA-Sequenz *shZNF423-#62* vermittelt einen ZNF423-Knockdown

Hauptziel dieser Arbeit war es, mittels RNA-Interferenz einen ZNF423-Knockdown zu vermitteln, um die Folgen eines solchen Knockdowns in leukämischen Zellen zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden 293T-Zellen mit einem ZNF423 α -Überexpressionsplasmid sowie 5 verschiedenen shRNA-Sequenzen co-transfiziert. Unter allen shRNAs zeigten die beiden Sequenzen *shZNF423-#62* und *-#63* eine gute Knockdown-Effizienz. In den weiteren Versuchen mit den ALL-Zelllinien wurde die Sequenz *shZNF423-#62* verwendet, dort zeigte diese auch durchgehend sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene einen effizienten Knockdown von ZNF423. Somit wurde ein effektiver Ansatz für das *gene silencing* von ZNF423 gefunden. Inwieweit off-target-Effekte auftreten, wurde in dieser Arbeit nicht geprüft und bleibt zu klären.

5.2 ZNF423-Knockdown erhöht die CD79b-Promoteraktivität

Ein Charakteristikum der akuten lymphatischen Leukämie ist der Maturationsarrest der B-Zellen. Die Fähigkeit von ZNF423 den Transkriptionsfaktor EBF1 zu sequestrieren, führt dazu, dass die EBF1-Zielgene, die wichtige Faktoren für die B-Zellentwicklung sind, nicht transaktiviert werden können. Harder et al. konnten zeigen, dass sich die erhöhte Expression von ZNF423 negativ auf die Promoteraktivität des CD79b-Gens auswirkte⁴⁴. Diese Daten konnten reproduziert werden. Interessant war es, zu erfahren, ob ein Knockdown von ZNF423 wieder zu einer gesteigerten CD79b-Promoteraktivität führt. Die Reporterstudien zeigen, dass ein Knockdown von ZNF423 wieder zu einer Erhöhung der CD79b-Promoteraktivität führt, jedoch nicht wieder auf dasselbe Niveau wie vor der ZNF423-Überexpression. Die qRT-PCR-Untersuchungen zeigen, dass bei Überexpression ca. 8-mal mehr ZNF423-mRNA exprimiert wird, der Knockdown reduziert dies wieder auf das 1,3-fache der Ausgangslage. Trotz des fast kompletten Rückgangs der ZNF423-mRNA-Expression zeigt die Reporterstudie jedoch nur eine partielle Erhöhung der CD79b-Promoteraktivität. Grund hierfür könnte der zelluläre Stress sein, der durch die Transfektion ausgelöst werden kann. Außerdem wurde nicht die Proteinexpression evaluiert, da aus einer mRNA mehrere Proteine translatiert werden können. Somit

könnte trotz fast komplettem Rückgang der mRNA-Expression weiterhin geringe Mengen ZNF423 exprimiert werden, die die nur partielle Wiederherstellung der CD79b-Promoteraktivität erklären könnte. Nichtsdestotrotz ist dies ein experimenteller Erfolg, da gezeigt werden konnte, dass durch den ZNF423 Knockdown die Promoteraktivität von für die B-Zellreifung wichtigen Genen teilweise wiederhergestellt werden konnte.

5.3 697*-Zellen zeigen vermindertes Zellüberleben

Um die vorher gewonnenen Erkenntnisse auf leukämische Zellen zu übertragen, wurde in 697*-Zellen ein ZNF423-Knockdown durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend per FACS und qRT-PCR analysiert. Ziel dieser Analyse war es, zu überprüfen, ob eine stabile Transduktion mittels lentiviraler Partikel möglich ist, ob ein Knockdown in ALL-Zelllinien vermittelt werden kann und ob sich das Zellüberleben ändert. In einem Zeitraum von 5 Tagen (*Tag 4 nach Transduktion bis Tag 8 nach Transduktion*) konnte eine stabile Transduktion sowie ein konstanter ZNF423-Knockdown dargestellt werden. Im Hinblick auf das Zellüberleben konnte gezeigt werden, dass mit der Zeit die ZNF423-Knockdown-Zellen weniger vitale Zellen aufweisen als die Kontrollen. Dies spricht dafür, dass ZNF423 eine zentrale Rolle im Zellüberleben und -wachstum leukämischer Zellen spielt. Inwiefern dieses Phänomen durch eine erhöhte Apoptose oder eine verringerte Proliferation hervorgerufen wird, wurde in 697*-Zellen nicht geprüft und bleibt zu klären. Ziel war es vorerst erste Erkenntnisse über die Effizienz des Knockdowns in ALL-Zelllinien zu gewinnen. Detailliertere Untersuchungen erfolgten anschließend in den ALL-Zelllinien REH, SEM und SUP-B15.

5.4 REH-Zellen exprimieren kein messbares ZNF423 auf Proteinebene

Die Zelllinie REH wurde ursprünglich für die Untersuchungen herangezogen, da sie eine erhöhte Expression von ZNF423 aufweist (*Horstmann et al., unpublizierte Daten*). Die Analysen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die REH-Zellen kein durch Western Blot detektierbares ZNF423 exprimieren. Womöglich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine fehlannotierte Zelllinie verwendet, da auch Untersuchungen des Zellzyklus (*Daten nicht gezeigt*) die Daten von Horstmann et al. (*unpublizierte Daten*) nicht reproduzieren konnten. Dementsprechend ist auf dem Western Blot kein Unterschied zwischen Knockdown und Kontrolle zu sehen. Durch qRT-PCR konnte ein Knockdown von

ZNF423 nachgewiesen werden, die Aussagekraft ist jedoch gering, da die in dieser Arbeit verwendeten REH-Zellen eine sehr geringe endogene ZNF423 mRNA-Expression aufwiesen (*Daten nicht gezeigt*). Im Einklang mit diesen Voraussetzungen sind die Ergebnisse der FACS-Analysen sowie des Apoptose-Assays, die keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Knockdown aufzeigen konnten. Dies kann man als Hinweis nehmen, dass der ZNF423-Knockdown durch RNA-Interferenz mit der *YFP-shZNF423-#62* Sequenz keine, für das Zellüberleben relevante Nebeneffekte aufweist. Durch weitere Untersuchungen muss diese Frage aber weiter geklärt werden.

5.5 ZNF423 beeinflusst Überleben und Wachstum von SEM-Zellen

In der MLL-AF4-positiven Zelllinie SEM konnte eine starke Reduktion von ZNF423 bewirkt werden, die auf RNA- und Proteinebene dargestellt werden konnte und über 8 Tage nachweisbar war. In den FACS-Analysen, die den Anteil vitaler Zellen zur gesamten Zellpopulation darstellte, konnte man beobachten, dass die Knockdown-Zellen eine erhebliche Reduzierung der vitalen Zellen zeigten, die so in den Kontrollzellen nicht darstellbar war. Auch der Anteil der YFP-positiven Zellen nahm unter ZNF423-Knockdown ab, hier zeigt sich aber, dass auch die Kontrollzellen im gleichen Maße die YFP-positiven Zellen verloren. Ursächlich dafür könnte sein, dass die transduzierten und somit YFP-positiven Zellen empfindlicher sind und damit schneller untergehen. Da die Reduzierung der vitalen Zellen unter ZNF423-Knockdown höher war, spricht dies zusätzlich für eine erhöhte Apoptose und / oder eine geringe Proliferation. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die Resultate des Apoptose-Assays, dass ein Knockdown von ZNF423 in SEM-Zellen eine Verdopplung der Apoptoseinduktion hervorruft, während der BrdU-Proliferationsassay darstellt, dass gleichzeitig die Proliferation der Knockdown-Zellen auf die Hälfte sinkt. Somit zeigt sich eine deutliche Veränderung unter ZNF423-Knockdown, der einen Nachteil im Zellüberleben durch gesteigerte Apoptose und verminderte Proliferation vermittelt. Damit die Ergebnisse des Proliferations- und Apoptose-Assays nicht verfälscht werden, wurden die Zellen vorher nicht auf YFP sortiert, da dies zusätzlichen Stress für die Zellen bedeuten würde. Somit beziehen sich die Proliferations- und Apoptoseergebnisse zum Teil auf gemischte Zellpopulationen. Womöglich könnte dieser Effekt deutlicher sein, wenn man reine ZNF423 Knockdown-Populationen für die Versuche verwenden würde.

5.6 ZNF423-Knockdown führt zur geringeren Proliferation in SUP-B15-Zellen

Die BCR-ABL1-positive Zelllinie SUP-B15 wurde mit der doppelten Menge lentiviraler Partikel transduziert, da die Transfektion dieser Zelllinie sich schwierig gestaltete. Die Transduktionseffizienz nahm nach 8 Tagen um 20 % ab, sowohl für den Knockdown als auch für die Kontrolle. Auf Proteinebene sieht man an Tag 4 nach Transduktion einen fast vollständigen Knockdown von ZNF423, auf mRNA-Ebene zeigt sich an Tag 4 nach Transduktion ein starker Knockdown, während an Tag 8 die ZNF423-mRNA-Expression wieder auf 70 % steigt. In den FACS-Analysen bezüglich des Anteils vitaler Zellen und im Apoptoseassay konnte kein eindeutiger Nachteil für die Zellen mit ZNF423-Knockdown dargestellt werden. Es zeigt sich im Apoptoseassay an Tag 8 vergleichsweise eine etwas höhere Apoptoseinduktion der Knockdown-Zellen ca. um das 1,6-fache. Betrachtet man den Verlauf der absoluten Zahlen (*s. Anhang*) scheint dies kein eindeutiger Beweis zu sein, dass ZNF423-Knockdown-Zellen eine höhere Apoptoserate haben. Im Proliferations-Assay durch BrdU-Inkorporation befindet sich jedoch unter ZNF423-Knockdown ein geringerer Anteil der Zellen in der S-Phase. Dies lässt darauf schließen, dass ZNF423 eine Rolle in der Proliferation von SUP-B15-Zellen spielt. Auch hier hätten die Ergebnisse potenziell schärfer herausgearbeitet werden können, wenn die Zellen vorher mittels FACS sortiert worden wären. Dies wurde wegen des zu erwartenden zusätzlichen Stresses für die Zellen und des Einflusses auf die Proliferation verworfen.

5.7 Abhängigkeit von ZNF423 in verschiedenen ALL-Zelllinien

Im Vergleich zu den SEM-Zellen zeigen die SUP-B15 einen schwächeren Effekt des ZNF423-Knockdown. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die BCR-ABL1-Translokation der SUP-B15-Zelllinie sein. ZNF423 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im BMP-Signalweg und spielt so eine Rolle in Wachstum und Apoptose. Normalerweise findet sich kein ZNF423 in B-Zellen, leukämische Zellen können jedoch ZNF423 aberrant exprimieren. Womöglich folgt daraus nicht nur die Sequestration von EBF1 und ein Maturationsarrest, sondern eine bessere Signalweiterleitung innerhalb des BMP-Signalwegs. Dies könnte zur erhöhten Proliferation und zu einer geringeren Apoptose führen und den Überlebensnachteil der SEM-Zellen mit ZNF423-Knockdown begründen. Bei den SUP-B15-Zellen wird dieser Nachteil wahrscheinlich durch die konstitutiv aktive ABL-Tyrosinkinase kompensiert, die das Genprodukt der BCR-ABL1-

Translokation ist. Durch Veränderungen verschiedener Signalwege wie z. B. JAK-STAT⁷ spielt ZNF423 wahrscheinlich keine essentielle Rolle für Wachstum und Apoptose in diesen Zellen. Interessant wäre hier die Evaluierung eines ZNF423-Knockdowns in Verbindung mit einem Tyrosinkinaseinhibitor wie z. B. Imatinib.

5.8 RNA-Interferenz als Methode für die Gen-Inaktivierung

Die RNA-Interferenz wurde erstmals 1998 vollständig beschrieben als ein Mechanismus bei der es durch doppelsträngige RNA zur spezifischen Gen-Inaktivierung kommt⁶⁸. In relativ kurzer Zeit wurde dieser Mechanismus weiter studiert und es zeigte sich, dass die Spezifität durch kurze RNA-Stücke, die zur Ziel-mRNA komplementär sind, verliehen wird⁶⁹ und, dass durch Einbringen kurzer einsträngiger RNA in Zellen experimentell eine Gen-Inaktivierung erfolgen kann⁷⁰. Dies eröffnete eine neue Möglichkeit Gene zu erforschen und weitere Studien folgten, sodass der Weg der Gen-Inaktivierung durch die RNA-Interferenz weiter verbessert werden konnte. Es gibt jedoch neue Methoden die Expression von Genen zu reduzieren oder zu verhindern. Eine relativ neue Möglichkeit in das *genome editing* durch CRISPR/Cas9, welches ermöglicht spezifisch das Genom zu verändern, Gene oder Basensequenzen gezielt herauszuschneiden und so nicht nur einen Knockdown sondern einen Knockout zu vermitteln⁷¹. Auf den ersten Blick scheint diese Methode attraktiver, die Zielsetzung sollte jedoch vor Beginn der Methodenauswahl klar sein. Während bei der RNA-Interferenz der induzierte Effekt revidierbar ist, ist ein Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9 nicht mehr rückgängig zu machen. Außerdem ist im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten die partielle Gen-Inaktivierung realistischer, da durch Medikamente ein komplettes Blocken bestimmter Faktoren häufig nicht der Fall ist⁷¹. Alternativ kann man die CRISPRi (*CRISPR interference*) - Methode nutzen, mit der das Ausmaß des Gen-Knockdowns regulierbar und der Effekt reversibel ist⁷². Die Etablierung solcher Systeme mittels CRISPR stellt jedoch Probleme dar, da Schritte wie Einzelzellsortierung hohen Stress für die Zellen bedeutet und womöglich Primärmaterial für diese Methoden nicht geeignet wäre⁷¹. Insofern war es in dieser Arbeit wichtig eine Gen-Stilllegung durch die RNA-Interferenz zu vermitteln, um zukünftig ein effektives Werkzeug für weitere Untersuchungen in der Hand zu haben.

5.9 RNA-Interferenz als therapeutisches Werkzeug

Die gesteuerte Inaktivierung spezifischer Gene kann in der Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen sowie in der Onkologie Anwendung finden. Die Gen-Inaktivierung durch RNA-Interferenz erfolgt durch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (*siRNA*), die im RISC (*RNA-induced silencing complex*) vom Enzym *Argonaute 2* in einzelsträngige RNA aufgespalten wird und den RISC in eine aktive Form überführt⁷³. Gleichzeitig fungiert diese Einzelstrang-RNA als Leitstrang, die dazu komplementäre mRNA bindet an diese und wird vom RISC abgebaut, die Translation kann nicht stattfinden und das Gen wird dadurch inaktiviert⁷⁴. Dieser Prozess ist ein Teil des Zell-Haushaltes, durch die exogene Zufuhr von spezieller siRNA kann dies zur Inaktivierung beliebiger Gene führen. Zu hohe Dosen von exogen zugeführter siRNA können den Untergang der Zellen bewirken, da es zu einer Übersättigung der RNA-Interferenz Signalwege kommt und der zelleigene RNA-Abbau nicht mehr regelhaft ablaufen kann⁷⁵. Außerdem kann es zu off-target-Effekten kommen, wenn partiell komplementäre mRNA an den Leitstrang im RISC bindet⁷⁶. Die größte Hürde im therapeutischen Nutzen ist jedoch die gezielte Verabreichung der siRNA. Die Bandbreite der Problematik geht von der Aktivierung des Immunsystems⁷⁷ bis zum liposomalen Abbau der siRNA bei der Zellaufnahme durch Endozytose⁷⁸. Da die Halbwertszeit unverpackter siRNA bei systemischer Gabe unter 10 Minuten beträgt⁷⁹, wird eine Transportform benötigt. Eine Transportmöglichkeit sind Lipidpartikel und werden *in vitro* bereits in Form von *Lipofectamine 2000* genutzt⁸⁰. Die interferierende RNA wird von Lipidpartikeln umschlossen, die nach innen hydrophil und nach außen lipophil sind. So wird die Aufnahme der RNA in die Zelle vereinfacht⁸⁰. Zimmermann et al. konnten zeigen, dass siRNA, gerichtet gegen das Apolipoprotein B (*ApoB*) und verpackt in SNALP (*stable nuclear acid lipid particles*), 24 h nach systemischer Verabreichung bei Affen die Expression von ApoB verringerte und den Cholesterinwert senkte⁸¹. Dieser Effekt hielt für 11 Tage an⁸¹. Nichtsdestotrotz zeigen sich aktuell die geringsten Problemstellungen bei lokaler Anwendung, z. B. bei der Therapie von RSV (*respiratory syncytial virus*), bei der Mäusen inhalativ siRNA verabreicht wurden⁸². Barrieren wie die systemische Eliminierung, die Überwindung der Gefäßwand und des Interstitiums bis zur Ankunft zur Zielzelle sind bei lokaler Anwendung nicht vorhanden oder weniger stark ausgeprägt.

5.10 Zukunftsperspektiven

Da ein ZNF423-Knockdown nachweislich Auswirkungen auf das Zellüberleben und Wachstum leukämischer Zellen mit hoher ZNF423-Expression hatte, wäre der nächste Schritt die Übertragung dieser Erkenntnisse von ALL-Zelllinien auf Primärmaterial und *in vivo* Versuchen. Vor allem im Hinblick auf die ungünstigere Prognose bei ETV6-RUNX1-negativen Leukämien mit hoher ZNF423 Expression wären die Effekte eines ZNF423-Knockdown in diesen Zellen interessant. So könnten neue Therapiemöglichkeiten für diese Patienten entwickelt werden, die gezielt die Problematik der ZNF423-Überexpression angreifen. Eine Korrektur der aberranten Überexpression von ZNF423 könnte die B-Zellreifung wieder in Gang setzen, wenn EBF1 nicht mehr in hohem Maße sequestriert wird und EBF1-Zielgene exprimiert werden können. Gleichzeitig kann die moderne Chemotherapie verbessert werden. ZNF423 bildet mit PARP1 ein Heterodimer, spielt somit eine Rolle in der DNA-Reparatur und es konnte gezeigt werden, dass bei Depletion der ZNF423-mRNA Zellen sensibler auf DNA-schädigende Substanzen reagieren⁴⁸. Geringere Dosen würden mehr Wirkung erzielen, wenn die DNA-Reparatur der leukämischen Zellen fehlerhaft ist. Inwiefern diese neue Therapiemöglichkeit durch die RNA-Interferenz vermittelt wird, bleibt zu klären, da vor allem die Aufnahme der interferierenden RNA durch die Zellen weiterhin eine Herausforderung darstellt. siRNA, gerichtet gegen ZNF423 und verpackt in Lipidpartikel könnten eine wirksame Transportform sein, jedoch ist das Risiko von Nebenwirkungen, vor allem in Bezug auf die Beteiligung von ZNF423 in der DNA-Reparatur, sehr hoch. Dieses Problem kann man umgehen, wenn man siRNA in Konjugate verpackt, die spezifisch an einen Rezeptor binden⁸⁰. Als Rezeptor käme das CD19-Antigen infrage, welches auf B-Zellen exprimiert wird.

6 Zusammenfassung

In der normalen Hämatopoese spielt der Transkriptionsfaktor EBF1 eine essentielle Rolle durch die Transaktivierung von – für die B-Zelldifferenzierung wichtigen – Faktoren. Der Zinkfingerfaktor ZNF423 ist durch seine Zinkfingerdomänen in der Lage, EBF1 zu sequestrieren und die Transaktivierung der EBF1-Zielgene zu verhindern. Normalerweise kommt ZNF423 in hämatopoetischen Zellen nicht vor, bei akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter wird die aberrante Expression von ZNF423 durch Promoter-Hypomethylierung jedoch beobachtet. Somit spielt ZNF423 eine wichtige Rolle im Maturationsarrest von B-Zellen, einem Charakteristikum der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter. Die schlechtere Prognose ETV6-RUNX1 negativer Leukämien mit ZNF423-Expression unterstreicht diese Annahme.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von ZNF423 mittels RNA-Interferenz möglich ist und sich auf das Zellverhalten leukämischer Zellen auswirkt. In Reporterstudien zeigte sich, dass ein ZNF423-Knockdown die CD79b-Promoteraktivität erhöht und, dass die ALL-Zelllinie 697* unter ZNF423-Knockdown einen Verlust an vitalen Zellen aufweist. Außerdem zeigt die MLL-AF4-positive ALL-Zelllinie SEM eine erhöhte Apoptose und eine reduzierte Proliferation sowie die BCR-ABL1 positive ALL-Zelllinie SUP-B15 eine verringerte Proliferation bei ZNF423-Knockdown. Diese Ergebnisse lassen darauf deuten, dass ZNF423 eine zentrale Rolle in der Regulation von Wachstum und Apoptose in leukämischen Zellen spielt.

7 Abstract

In normal hematopoiesis the transcription factor EBF1 plays an essential role by transactivating factors important for B cell differentiation. With its zinc finger domains the zinc finger factor ZNF423 is able to sequester EBF1 and prevent the transactivation of EBF1 target genes. Usually, ZNF423 is not present in hematopoietic cells. However, aberrant expression of ZNF423 is observed after promoter hypomethylation in acute lymphocytic leukemias in childhood. Therefore, ZNF423 plays an important role in arrested differentiation of B cells, a characteristic of acute lymphatic leukemia in childhood. The poorer prognosis of ETV6-RUNX1 negative leukemia with ZNF423 expression further supports this assumption.

In this study we were able to show that a knockdown of ZNF423 by RNA interference is possible and that a knockdown affects the development of leukemic cells. In reporter gene studies, we have shown that a ZNF423 knockdown led to an increase in CD79b promoter activity and showed a decrease in the number of viable cells of the ALL 697* cell line. In addition, the MLL-AF4 positive ALL SEM cell line showed an increase in apoptosis and reduced proliferation while the BCR-ABL1 positive ALL SUP-B15 cell line showed a reduced proliferation after ZNF423 knockdown. These results suggest that ZNF423 plays a key role in the regulation of growth and apoptosis in leukemic cells.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
B2M	β2-Mikroglobulin
BCR-ABL	„breakpoint cluster region“ – „Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“
BMP	bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRE	BMP-responsive elements
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CD	cluster of differentiation
CDS	coding sequence
CLP	common lymphoid progenitor
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia Coli
EBF1	early B-cell factor 1
ELP	early lymphoid progenitor
ETV6-RUNX1	„ETS-variant gene 6“ – „Runt-related transcription factor 1“
FACS	fluorescence activated cell sorting“
FSC-A	Forward Scatter – Area
FSC-H	Forward Scatter – Height
FSC-W	Forward Scatter – Width
HOX-Gen	Homeobox-Gen

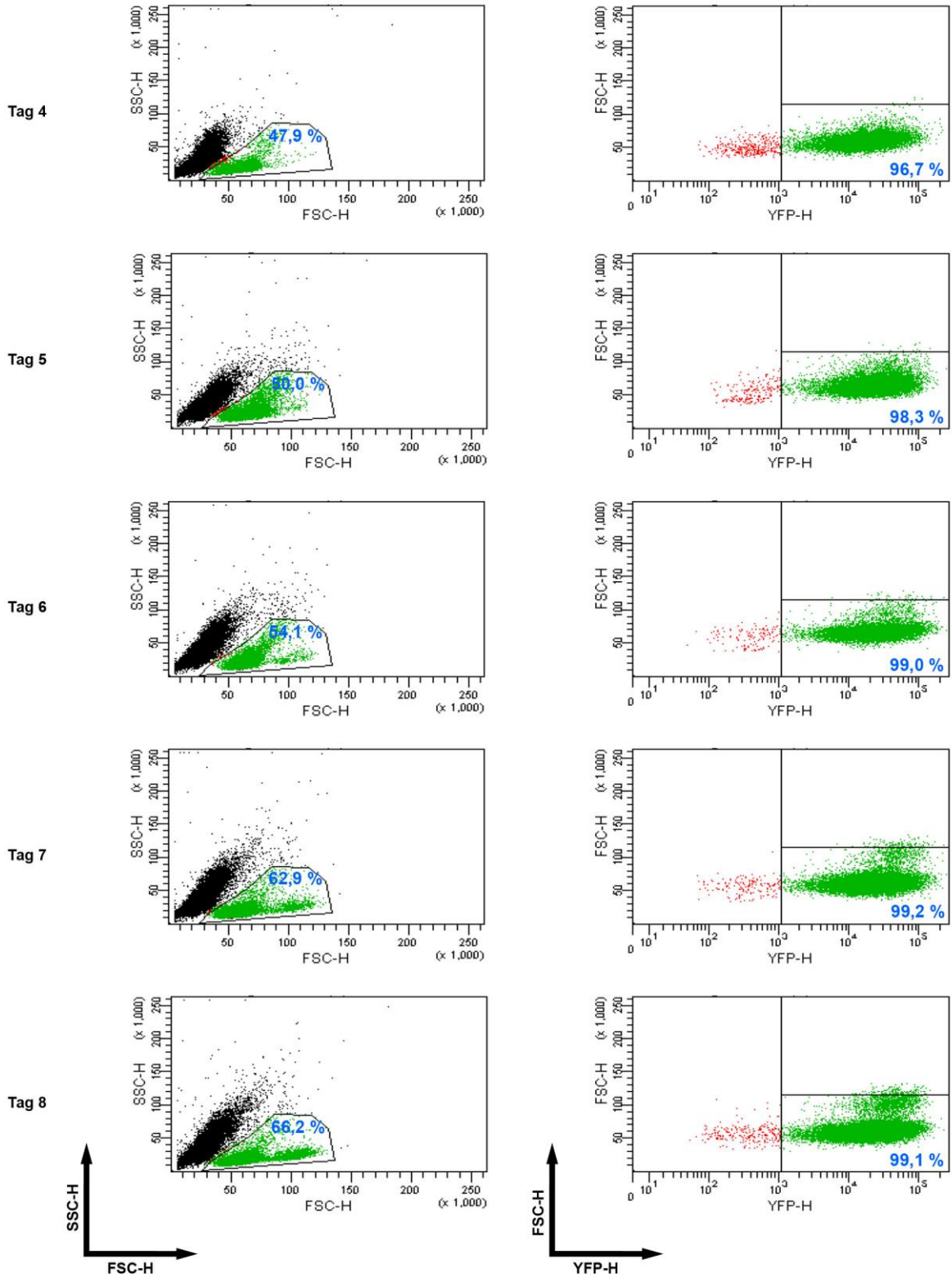
Anhang

hPGK	humane Phosphoglyceratkinase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
MLL	mixed lineage leukemia
NID	NuRD-interacting domaine
NK	natürliche Killerzellen
NuRD	nucleosome remodeling and deacetylase
OAZ	Olf1/EBF associated zinc finger protein
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PI	Propidiumiodid
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
qRT-PCR	quantitative Echtzeit – Polymerase Kettenreaktion
RAR	retinoid acid receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
Roaz	Rat Olf1/EBF associated zinc finger protein
RXR	retinoid x receptor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SNALP	small nuclear acid lipid particles
SOC-Medium	Super optimal broth with Catabolite repression
SSC-A	Side Scatter – Area
SSC-H	Side Scatter – Height
SSC-W	Side Scatter – Width
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
tGFP	turbo – green fluorescent protein
TGF- β	transforming growth factor β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
YFP	yellow fluorescent protein
Zfp423	murines ZNF423
Zfp521	murines ZNF521
ZNF423	Zinkfingerfaktor 423
ZNF521	Zinkfingerfaktor 521

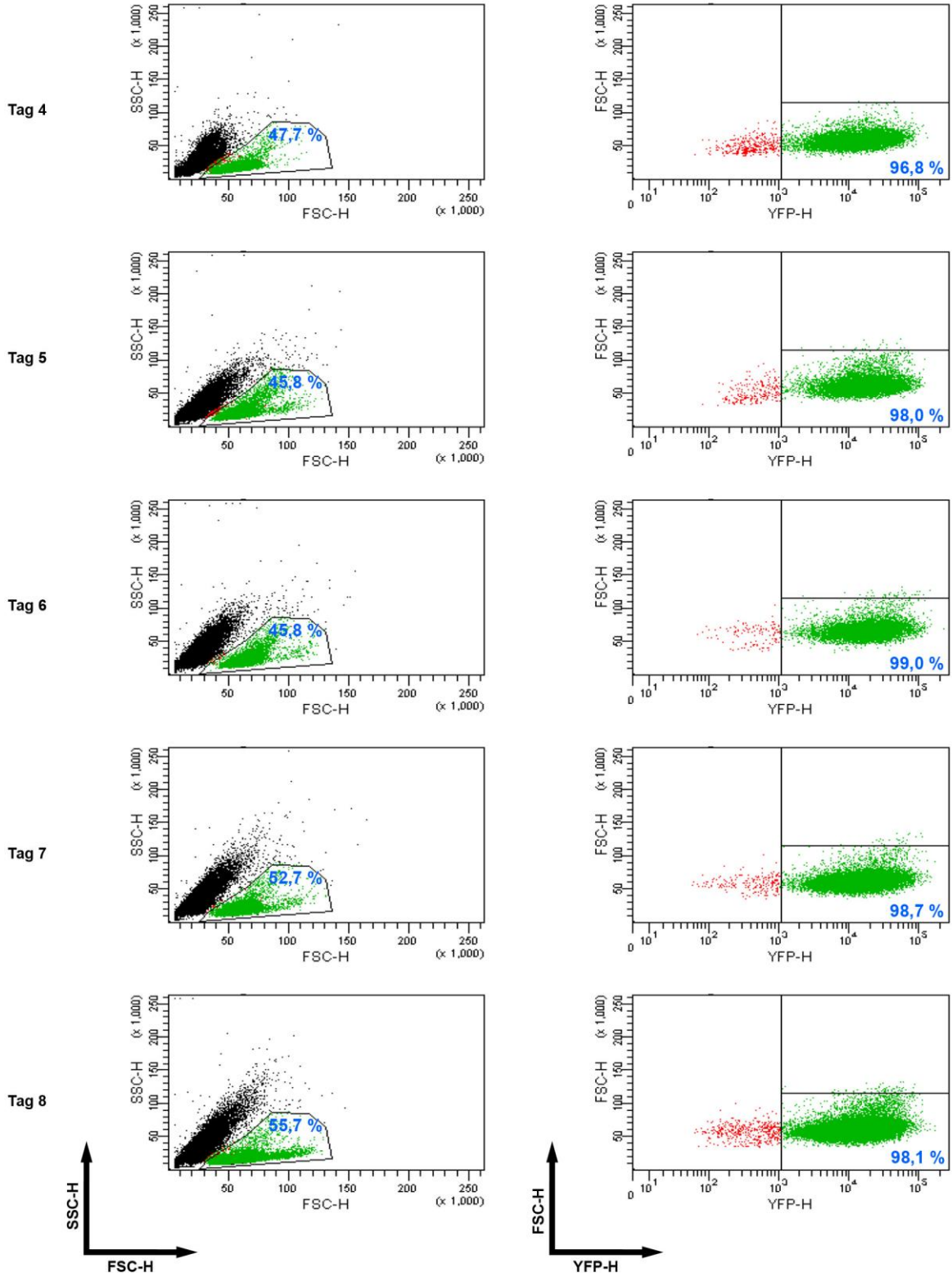
8.2 FACS Plots

8.2.1 697*-Zelllinie

YFP-empty



YFP-shSCR



YFP-shZNF423-#62

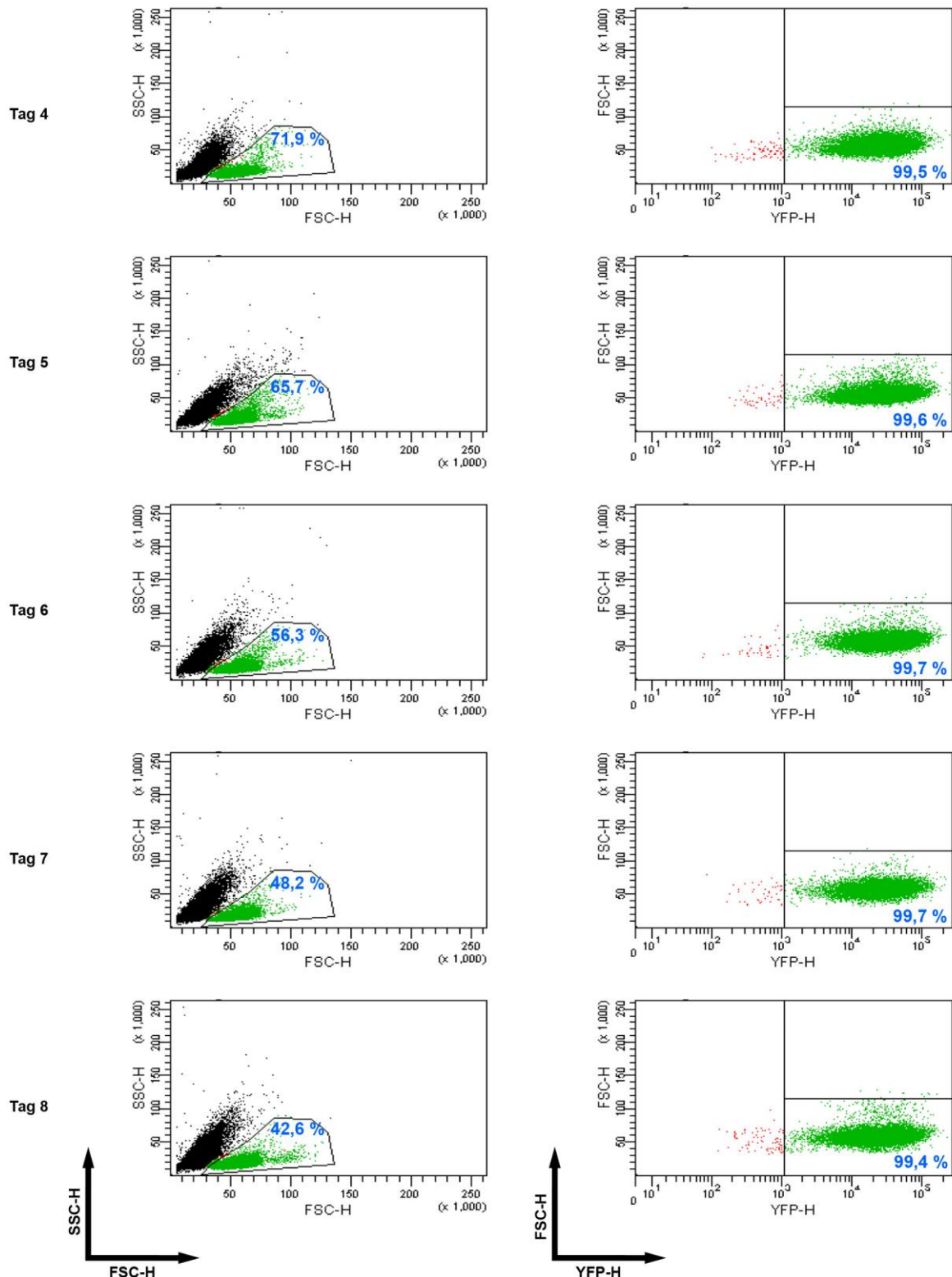
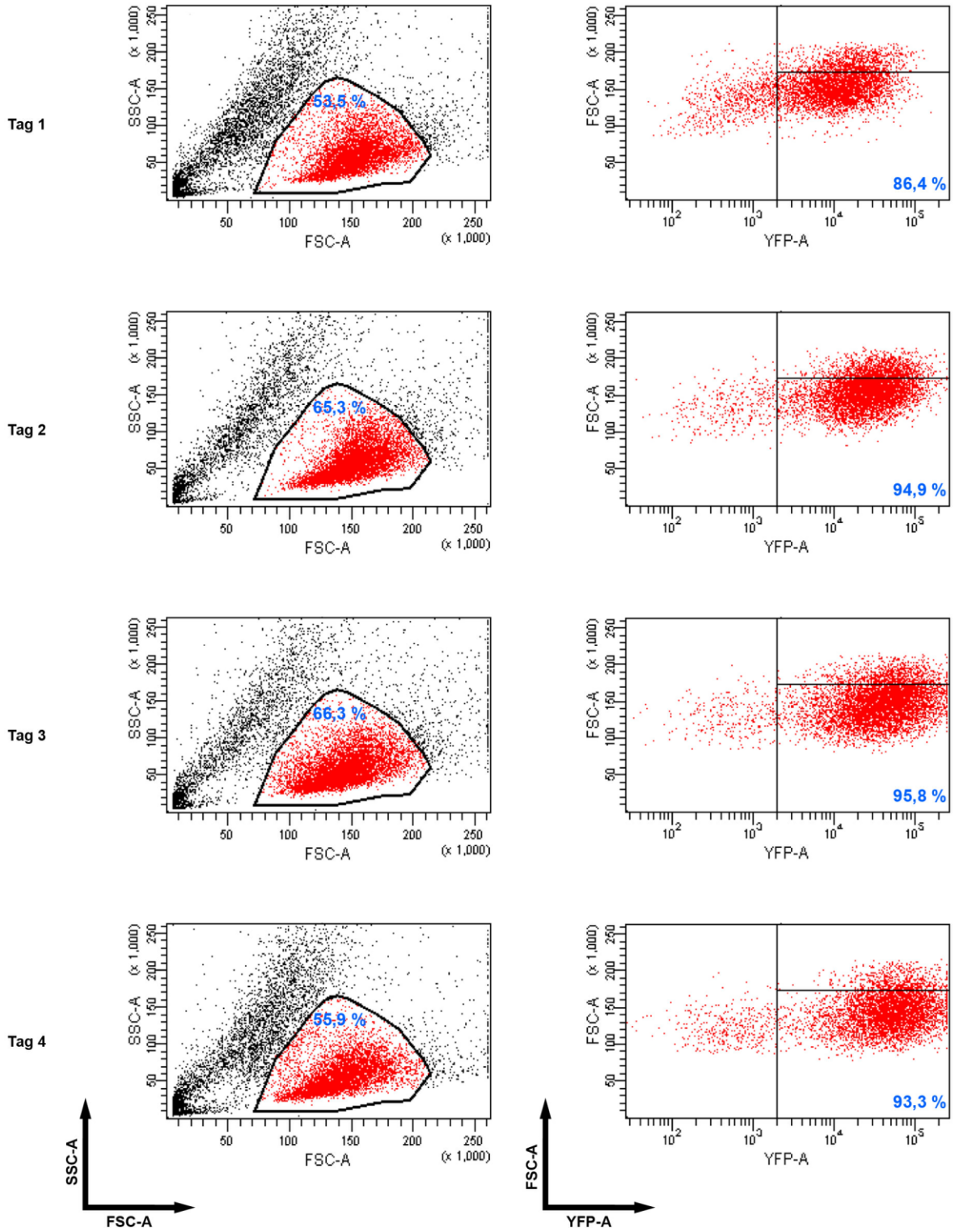


Abbildung 19: Transduktion der 697*-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 11 (A) und Abb. 11 (B)

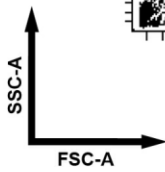
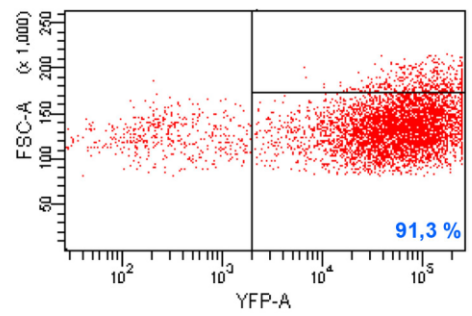
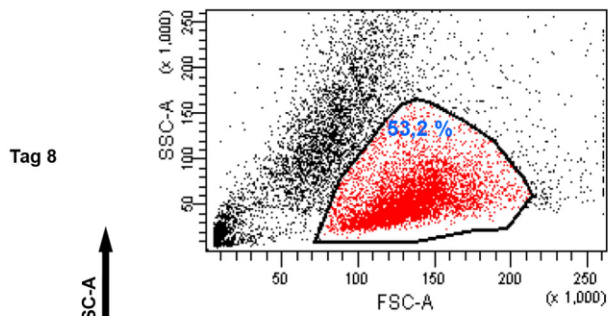
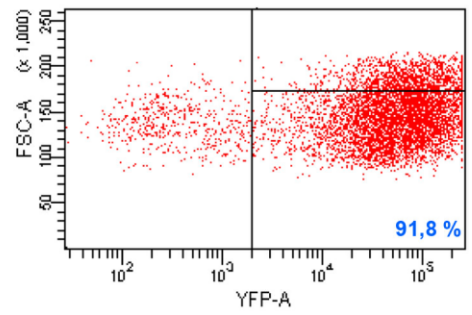
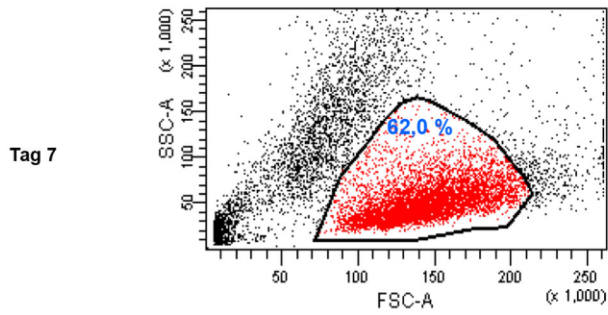
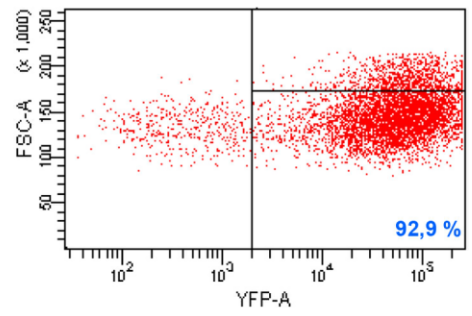
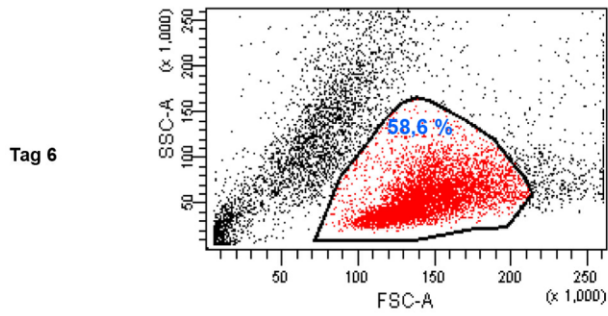
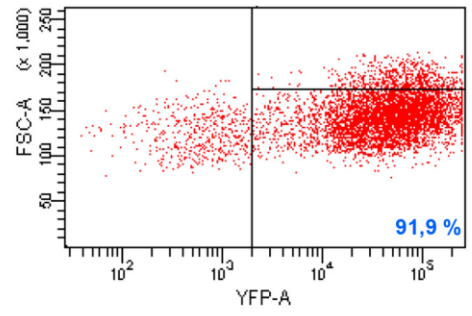
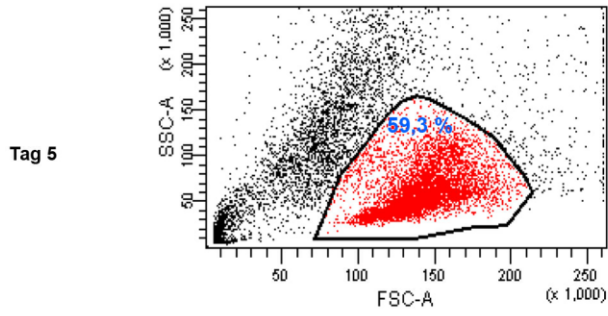
697*-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die die Plasmide *YFP-empty*, *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 450 μ l DPBS vermisch und 1 Minute am BD FACS Canto bei mittlerer Flussgeschwindigkeit (72 μ l / Minute) analysiert. Anhand von Forward Scatter und Side Scatter wurde ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen beinhaltet, dargestellt in den linken Plots. Der Anteil YFP-positiver Zellen in diesem Gate wurde untersucht, dargestellt in den rechten Plots.

8.2.2 REH-Zelllinie

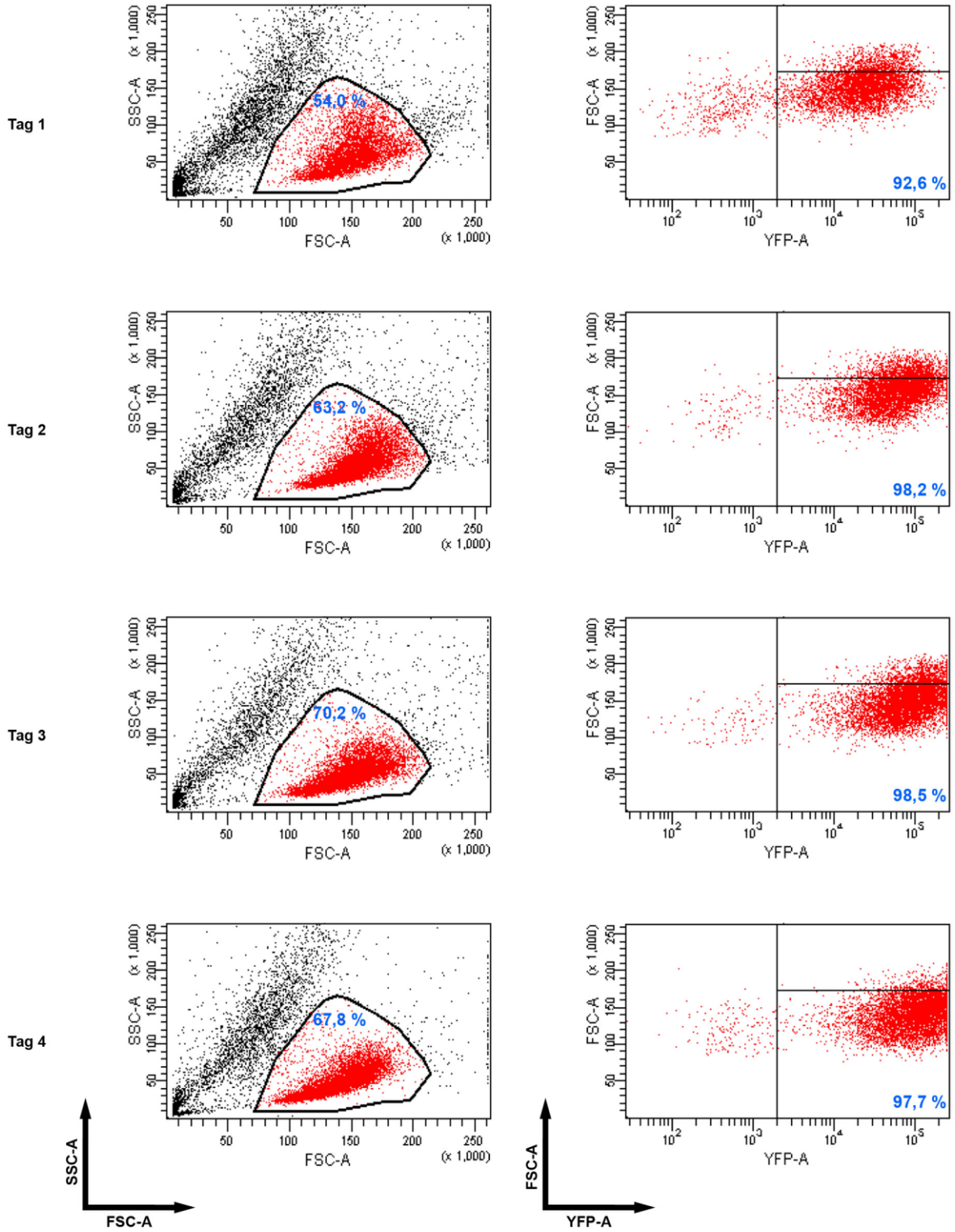
YFP-shSCR



YFP-shSCR
(Fortsetzung)



YFP-shZNF423-#62



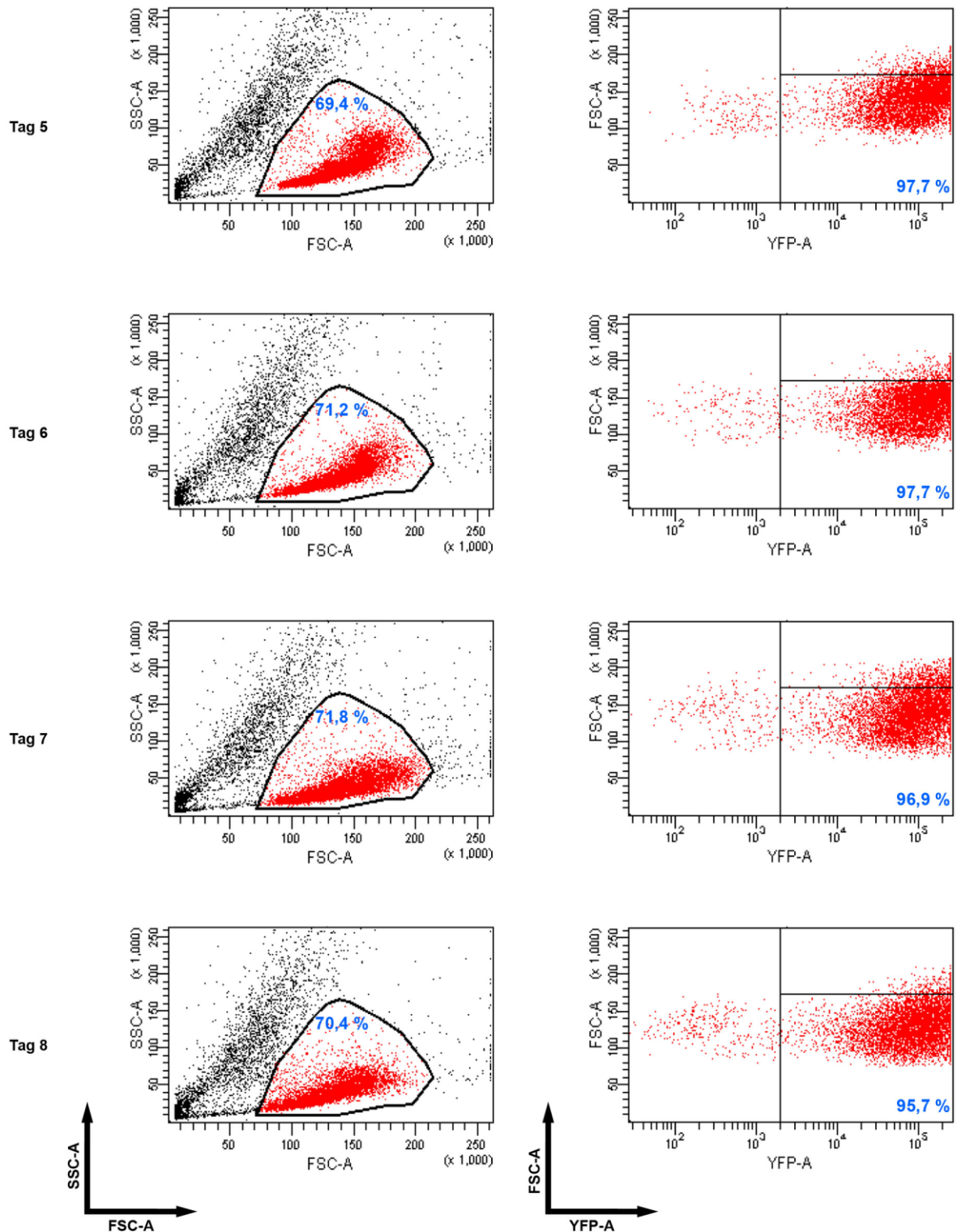
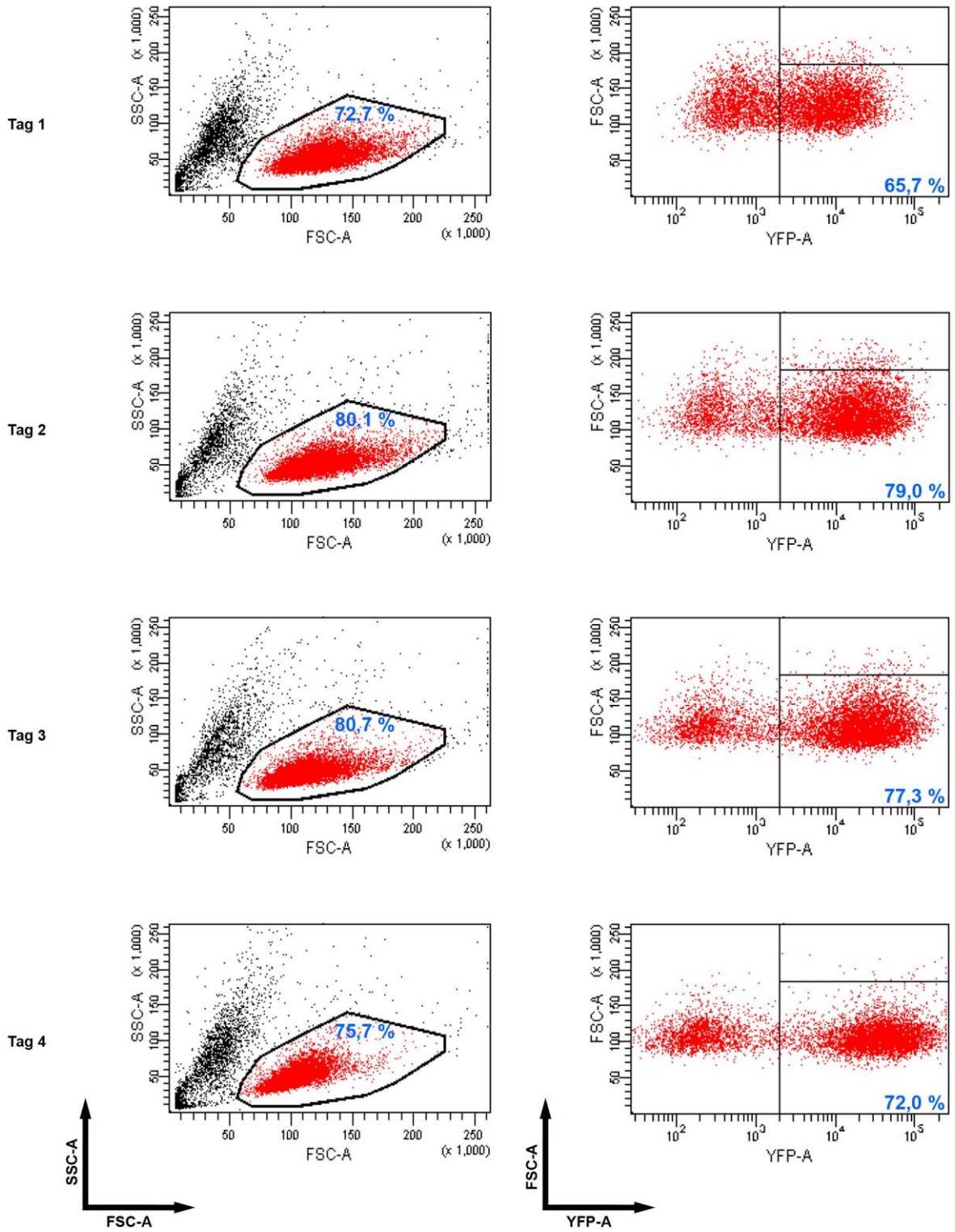
YFP-shZNF423-#62
(Fortsetzung)

Abbildung 20: Transduktion der REH-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (B)

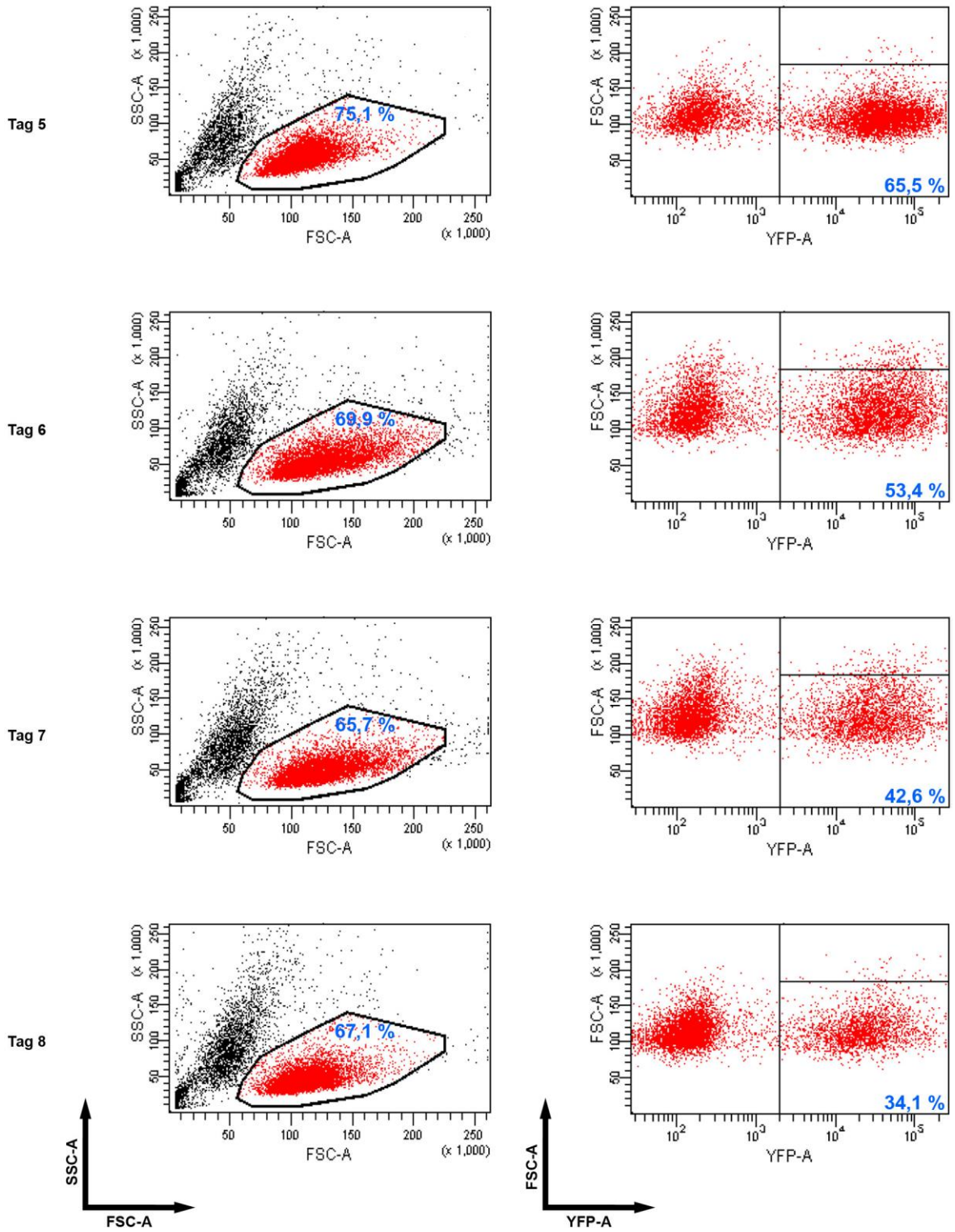
REH-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μl der Zellsuspension mit 450 μl DPBS vermischt und 1 Minute am BD FACS Canto bei mittlerer Flussgeschwindigkeit (72 μl / Minute) analysiert. Anhand von Forward Scatter und Side Scatter wurde ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen beinhaltet, dargestellt in den linken Plots. Der Anteil YFP-positiver Zellen in diesem Gate wurde untersucht, dargestellt in den rechten Plots.

8.2.3 SEM-Zelllinie

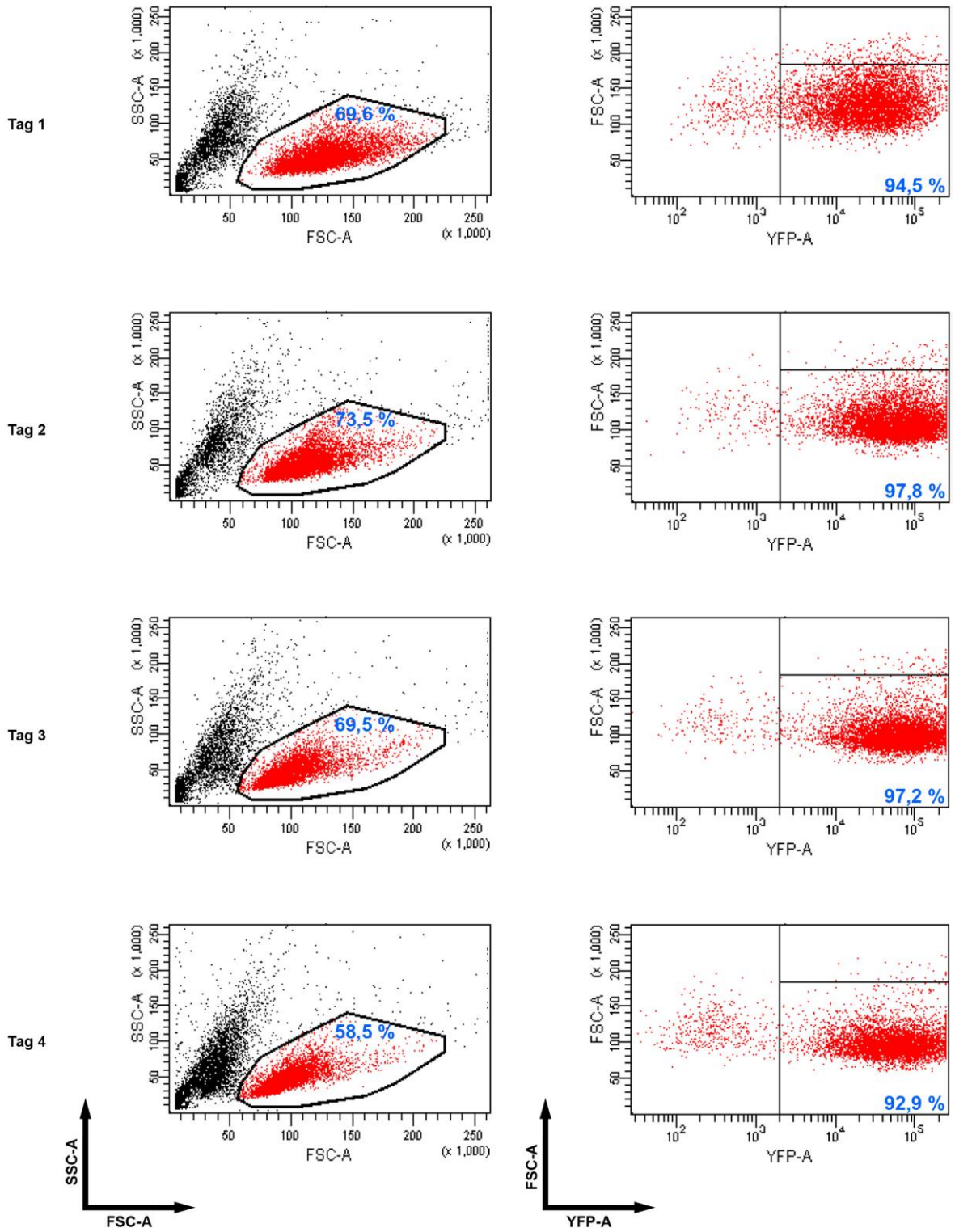
YFP-shSCR



YFP-shSCR
(Fortsetzung)



YFP-shZNF423-#62



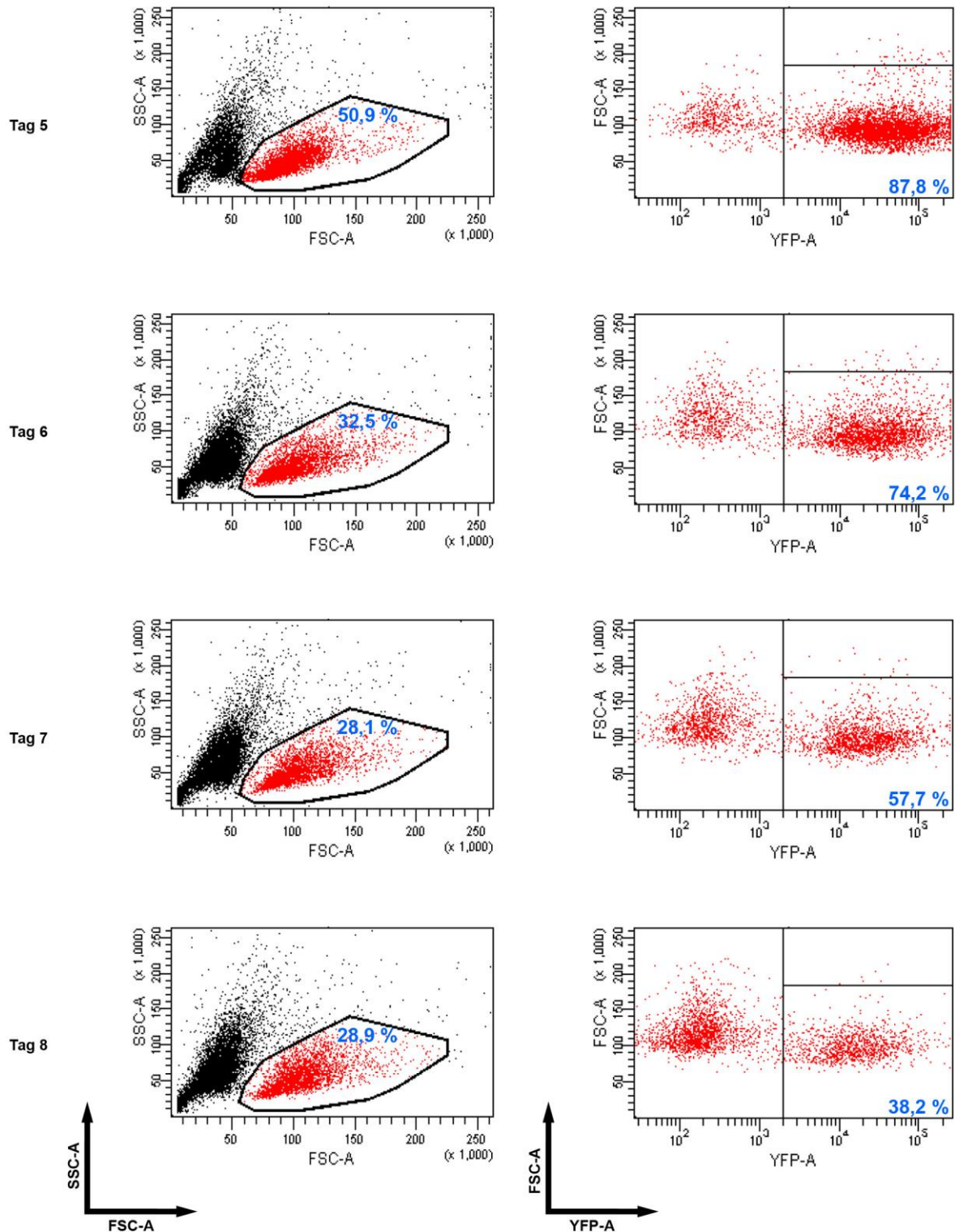
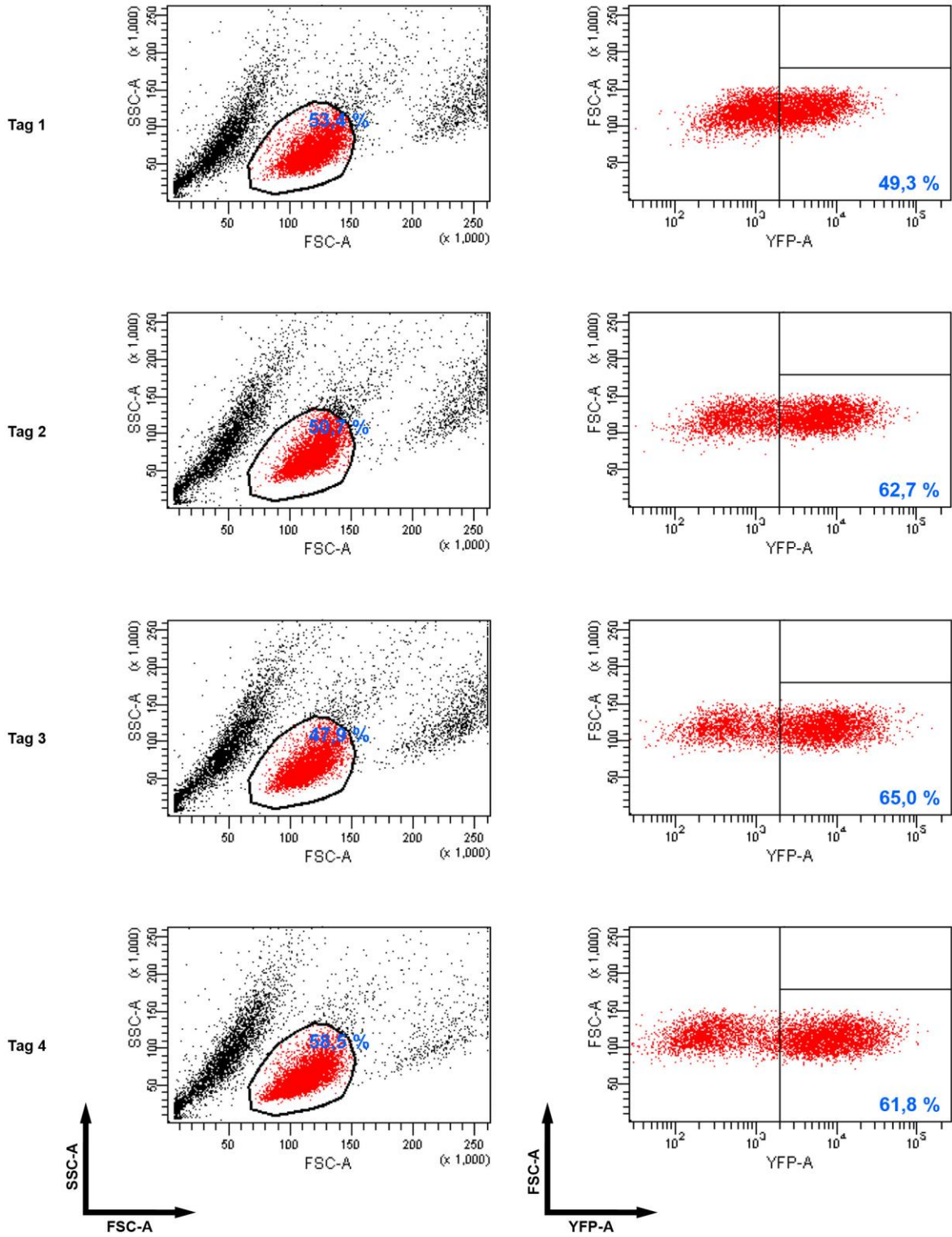
YFP-shZNF423-#62
(Fortsetzung)

Abbildung 21: Transduktion der SEM-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (C)

SEM-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μl der Zellsuspension mit 450 μl DPBS vermischt und 1 Minute am BD FACS Canto bei mittlerer Flussgeschwindigkeit (72 μl / Minute) analysiert. Anhand von Forward Scatter und Side Scatter wurde ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen beinhaltet, dargestellt in den linken Plots. Der Anteil YFP-positiver Zellen in diesem Gate wurde untersucht, dargestellt in den rechten Plots.

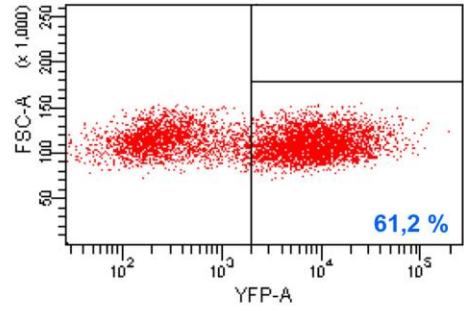
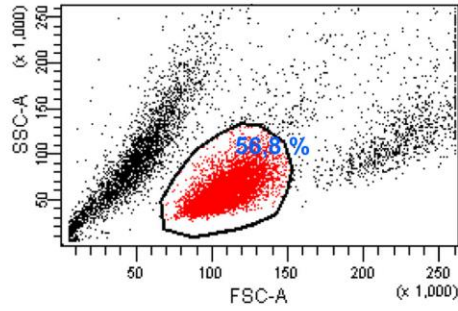
8.2.4 SUP-B15-Zelllinie

YFP-shSCR

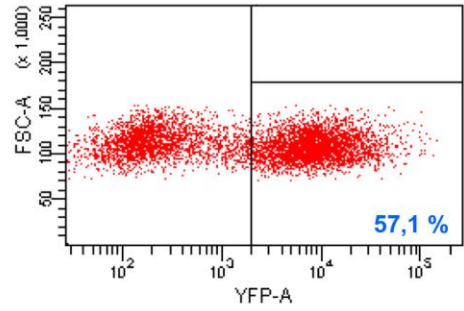
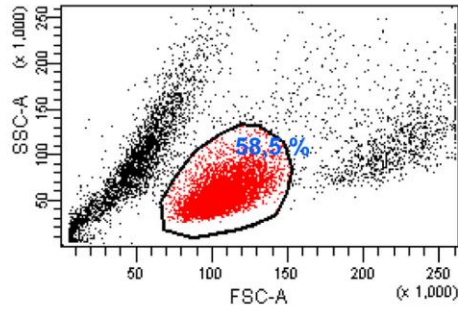


YFP-shSCR
(Fortsetzung)

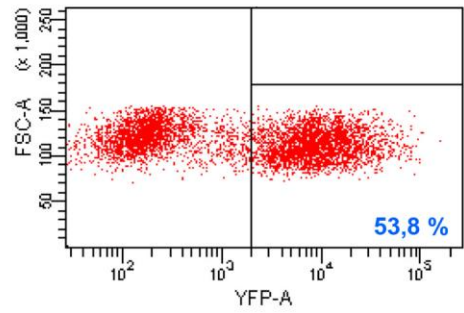
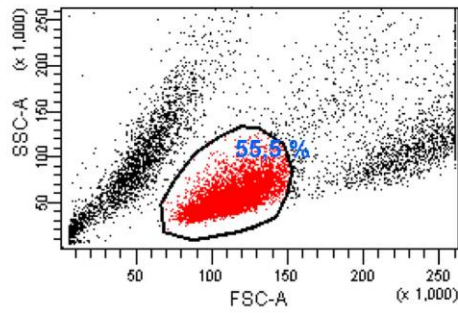
Tag 5



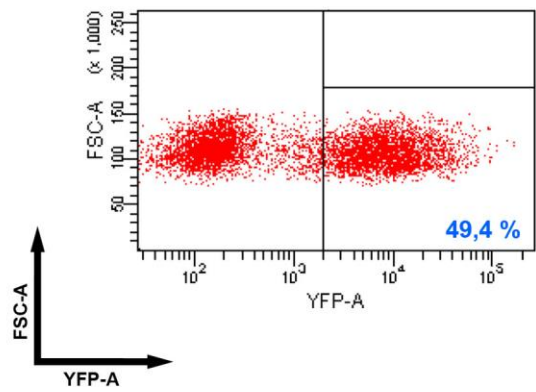
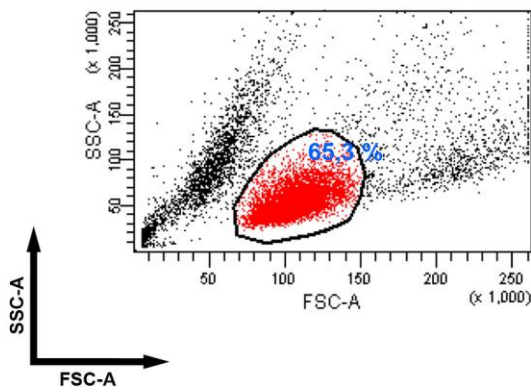
Tag 6



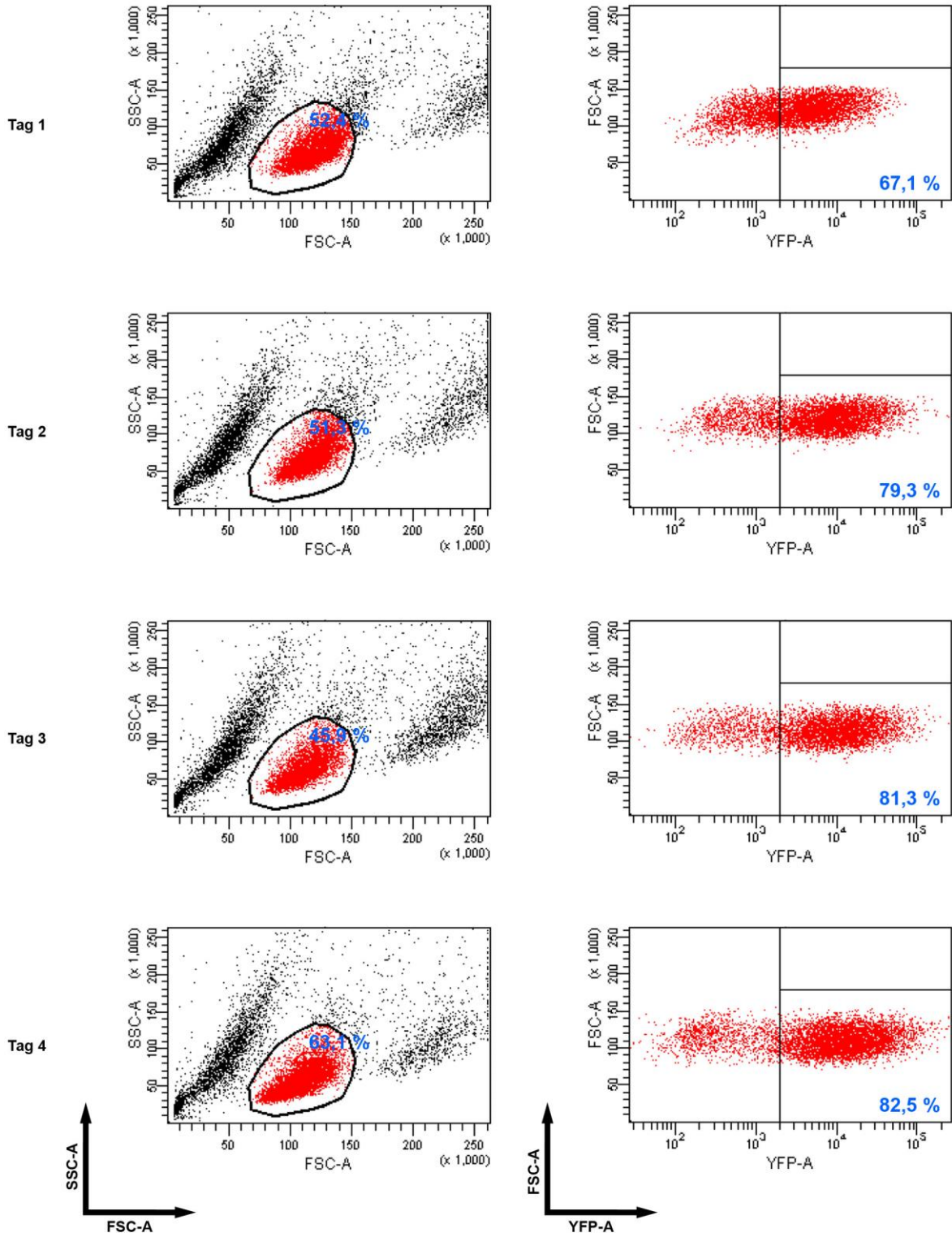
Tag 7



Tag 8



YFP-shZNF423-#62



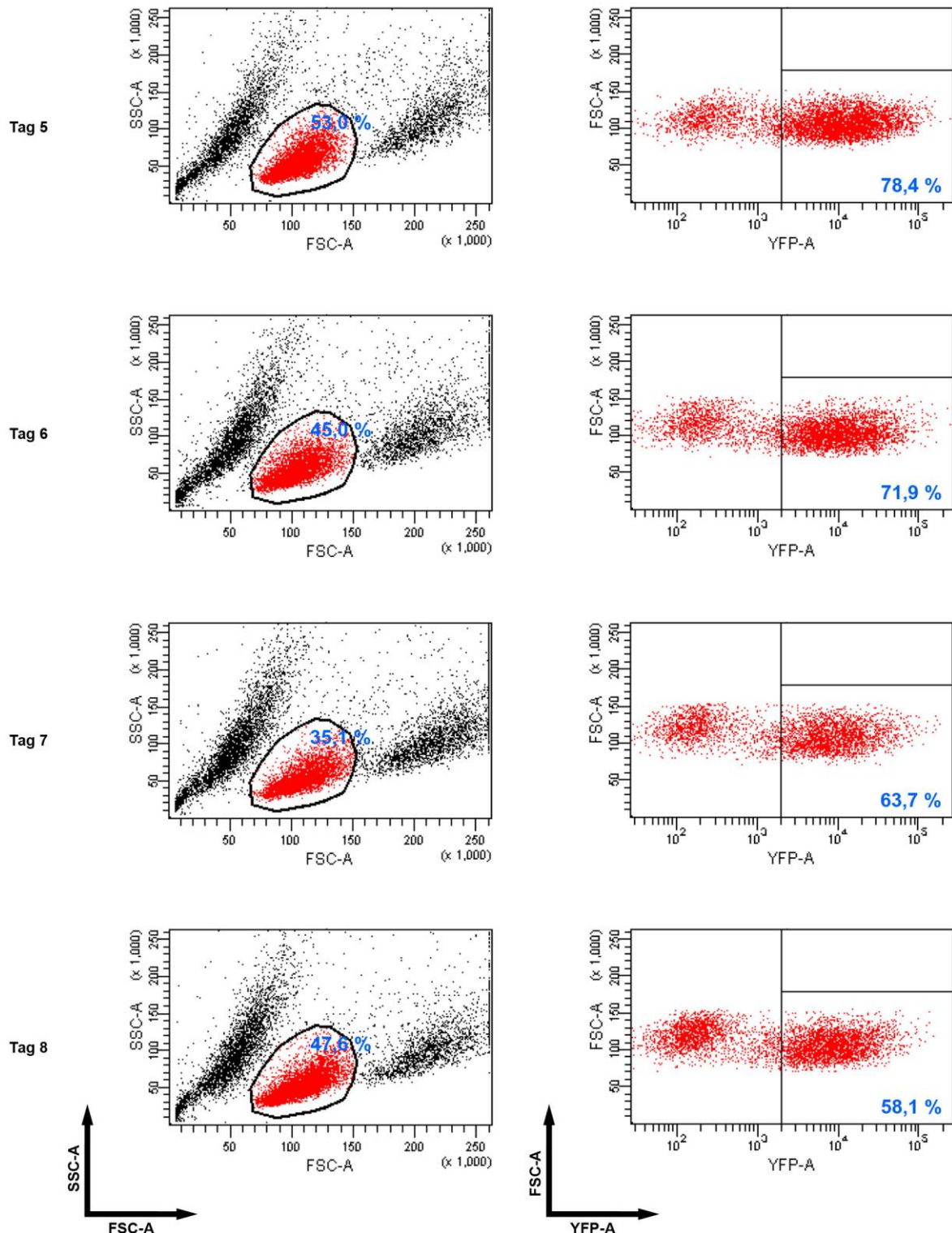
YFP-shZNF423-#62
(Fortsetzung)

Abbildung 22: Transduktion der SUP-B15-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (D)

SUP-B15-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die die Plasmide *YFP-shSCR* und *YFP-shZNF423-#62* enthielten, transduziert und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 450 μ l DPBS vermisch und 1 Minute am BD FACS Canto bei mittlerer Flussgeschwindigkeit (72 μ l / Minute) analysiert. Anhand von Forward Scatter und Side Scatter wurde ein Gate gesetzt, welches die vitalen Zellen beinhaltet, dargestellt in den linken Plots. Der Anteil YFP-positiver Zellen in diesem Gate wurde untersucht, dargestellt in den rechten Plots.

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Statistik über maligne Erkrankungen bei unter 18-jährigen (nach deutschem Kinderkrebs-register, Jahresbericht 2015 ¹).....	1
Abbildung 2: Die normale B-Zelldifferenzierung in den primären lymphatischen Organen	5
Abbildung 3: ZNF423 Struktur.....	7
Abbildung 4: ZNF423 Interaktionen in gesundem Gewebe.....	9
Abbildung 5: ZNF423 Regulation und Beteiligung in verschiedenen Erkrankungen	10
Abbildung 6: Übersicht der verschiedenen Untersuchungen in den einzelnen Zelllinien	28
Abbildung 7: Untersuchung der Knockdown-Effizienz durch Transfektion verschiedener shRNAs	30
Abbildung 8: Umklonierung der shRNA-Sequenz in einen neuen Vektor	31
Abbildung 9: Untersuchung der Knockdown-Effizienz durch Transfektion der pLKO.1-YFP-Plasmide.....	32
Abbildung 10: CD79b-Promoteraktivität unter ZNF423-Knockdown	33
Abbildung 11: Untersuchung der Transduktionseffizienz und Zellpopulation nach ZNF423-Knockdown in 697*-Zellen	34
Abbildung 12: ZNF423 Knockdown durch Transduktion in verschiedenen ALL-Zelllinien	36
Abbildung 13: Untersuchung der Zellpopulation und Transduktionseffizienz nach ZNF423-Knockdown in verschiedenen ALL-Zelllinien.....	38
Abbildung 14: Untersuchung der Apoptose in REH-Zellen	40
Abbildung 15: Untersuchung der Apoptose in SEM-Zellen	42
Abbildung 16: Untersuchung der Apoptose in SUP-B15-Zellen.....	43
Abbildung 17: BrdU-Proliferationsassay in SEM-Zellen mit ZNF423-Knockdown.....	45
Abbildung 18: BrdU-Proliferationsassay in SUP-B15-Zellen mit ZNF423-Knockdown.....	46
Abbildung 19: Transduktion der 697*-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 11 (A) und Abb. 11 (B).....	58
Abbildung 20: Transduktion der REH-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (B).....	61
Abbildung 21: Transduktion der SEM-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (C)	65
Abbildung 22: Transduktion der SUP-B15-Zelllinie – Vollständige Daten zu Abb. 13 (D)	69

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Kits.....	13
Tabelle 2:	Liste der primären Antikörper für Western Blots	13
Tabelle 3:	Liste der sekundären Antikörper für Western Blots.....	14
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen.....	14
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Geräte.....	14
Tabelle 6:	Liste der verwendeten Zelllinien	15
Tabelle 7:	Liste der verwendeten Medien und Reagenzien.....	16
Tabelle 8:	Auflistung der Expressionsplasmide	16
Tabelle 9:	Auflistung der shRNA-Sequenzen	17
Tabelle 10:	Auflistung der Plasmide für die Reportergenanalysen	18
Tabelle 11:	Auflistung der Plasmide für die Virusproduktion	18
Tabelle 12:	Rezept für das SOC-Medium.....	19
Tabelle 13:	Auflistung der Primersequenzen für die Mutagenese	20
Tabelle 14:	Übersicht der Primersequenzen für die Sequenzierung	20
Tabelle 15:	Temperaturprofil der quantitativen RT-PCR.....	22
Tabelle 16:	Auflistung der verwendeten Primer für die quantitative RT-PCR	22
Tabelle 17:	Auflistung der Medien für die Zellkultur.....	24

9 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P. & Spix, C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz* (2015).
2. Pui, C.H., Pei, D. & Campana, D., et al. Improved prognosis for older adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **29**, 386–391 (2011).
3. Pui, C.H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov* **6(2)**, 149–165 (2007).
4. Schrappe, M.C. Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien: Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen. *Deutsche Krebsgesellschaft* (2008).
5. Pui, C.H., Relling, M.V. & Downing, J.R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **350(15)**, 1535–1548 (2004).
6. Leoni, V. & Biondi, A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **100(3)**, 295–299 (2015).
7. Chopra, R., Pu, Q.Q. & Elefanty, A.G. Biology of BCR-ABL. *Blood Rev.* **13(4)**, 211–229 (1999).
8. Linka, Y. *et al.* The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer Journal* **3(10)**, e151 (2013).
9. Loh, M., *et al.* TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr. Op. Immun.* **9**, 345–352 (2002).
10. Zelent, A., Greaves, M. & Enver, T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* **23(24)**, 4275–4283 (2004).
11. Sanjuan-Pla, A. *et al.* Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **126(25)**, 2676–2685 (2015).
12. Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* (2017).
13. Pieters, R. *et al.* A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99). An observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)* **370**, 240–250 (2007).
14. Dreyer, Z.E. *et al.* Intensified chemotherapy without SCT in infant ALL. Results from COG P9407 (Cohort 3). *Pediatric Blood & Cancer* **62**, 419–426 (2015).
15. Armstrong, S.A. *et al.* MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics* **30(1)**, 41–47 (2002).
16. Mullighan, C. G., *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446(7137)**, 758–764 (2007).
17. Roberts, K.G. & Mullighan C. G. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr.* **23(1)**, 34–40 (2011).
18. Hof, J. *et al.* Mutations and Deletions of the TP53 Gene Predict Nonresponse to Treatment and Poor Outcome in First Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **29(23)**, 3185–3193 (2011).
19. Case, M., *et al.* Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **68(16)**, 6803–6809 (2008).
20. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429(6990)**, 457–463 (2004).
21. Bernstein, B.E., Meissner, A. & Lander, E.S. The Mammalian Epigenome. *Cell* **128(4)**, 669–681 (2007).
22. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16(1)**, 6–21 (2002).

23. Fazzari, M.J. & Grealley, J.M. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Reviews Genetics* **5(6)**, 446–455 (2004).
24. Hodges, E. *et al.* Directional DNA Methylation Changes and Complex Intermediate States Accompany Lineage Specificity in the Adult Hematopoietic Compartment. *Molecular Cell* **44(1)**, 17–28 (2011).
25. Cedar, H. & Bergman, Y. Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nature Reviews Immunology* **11(7)**, 478–488 (2011).
26. Melki, J.R. & Clark, S.J. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol* **12(5)**, 347–357 (2002).
27. Lebien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112(5)**, 1570–1580 (2008).
28. Fey, M.F. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol* **18**, suppl 1: i9-i13 (2007).
29. Fuxa, M. & Skok, J.A. Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr. Op. Immun.* **19(2)**, 129–136 (2007).
30. Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. *Annual review of immunology* **22**, 55–79 (2004).
31. Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A. & Licence, S. The pre-B-cell receptor. *Curr. Op. Immun.* **19(2)**, 137–142 (2007).
32. Kurosaki, T. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Current Opinion in Immunology* **12(3)**, 276–281 (2000).
33. Lebien, T.W. Fates of human B-cell precursors. *Blood* **96(1)**, 9–23 (2000).
34. Hagman, J., Travis, A. & Grosschedl, R. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *The EMBO Journal* **10(11)**, 3409–3417 (1991).
35. Wang, M.M. & Reed, R.R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast **364(6433)**, 121–126 (1993).
36. Lin, H. & Grosschedl, R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF **376(6537)**, 263–267 (1995).
37. O’Riordan, M. & Grosschedl, R. Coordinate Regulation of B Cell Differentiation by the Transcription Factors EBF and E2A. *Immunity* **11(1)**, 21–31 (1999).
38. Åkerblad, P., Rosberg, M., Leanderson, T. & Sigvardsson, M. The B29 (Immunoglobulin β -Chain) Gene Is a Genetic Target for Early B-Cell Factor. *Molecular and Cellular Biology* **19(1)**, 392–401 (1999).
39. Gisler, R. & Sigvardsson, M. The Human V-PreB Promoter Is a Target for Coordinated Activation by Early B Cell Factor and E47. *J Immunol* **168(10)**, 5130–5138 (2002).
40. Sigvardsson, M. Overlapping Expression of Early B-Cell Factor and Basic Helix-Loop-Helix Proteins as a Mechanism To Dictate B-Lineage-Specific Activity of the $\lambda 5$ Promoter. *Molecular and Cellular Biology* **20(10)**, 3640–3654 (2000).
41. Hagman, J., Gutch, M.J., Lin, H. & Grosschedl, R. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *The EMBO Journal* **14(12)**, 2907–2916 (1995).
42. Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C.W. & Grosschedl, R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev.* **7(5)**, 760–773 (1993).
43. Tsai, R.Y.L. & Reed, R.R. 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.* **17(11)**, 4159–4169 (1997).
44. Harder, L. *et al.* Aberrant ZNF423 impedes B cell differentiation and is linked to adverse outcome of ETV6-RUNX1 negative B precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **210(11)**, 2289–2304 (2013).
45. Hata, A. *et al.* OAZ Uses Distinct DNA- and Protein-Binding Zinc Fingers in Separate BMP-Smad and Olf Signaling Pathways. *Cell* **100(2)**, 229–240 (2000).

46. Harder, L., Puller, A.-C. & Horstmann, M.A. ZNF423: Transcriptional modulation in development and cancer. *Molecular & Cellular Oncology* **1(3)**, e969655 (2014).
47. Tsai, R.Y.L. & Reed, R.R. Identification of DNA Recognition Sequences and Protein Interaction Domains of the Multiple-Zn-Finger Protein Roaz. *Molecular and Cellular Biology* **18(11)**, 6447–6456 (1998).
48. Chaki, M. *et al.* Exome Capture Reveals ZNF423 and CEP164 Mutations, Linking Renal Ciliopathies to DNA Damage Response Signaling. *Cell* **150(3)**, 533–548 (2012).
49. Denslow, S.A. & Wade, P.A. The human Mi-2[[sol]]NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* **26(37)**, 5433–5438 (2007).
50. Hogan, B.L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* **10(13)**, 1580–1594 (1996).
51. Ku, M., Howard, S., Ni, W., Lagna, G. & Hata, A. OAZ Regulates Bone Morphogenetic Protein Signaling through Smad6 Activation. *J. Biol. Chem.* **281(8)**, 5277–5287 (2006).
52. Gupta, R.K. *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464(7288)**, 619–623 (2010).
53. Cheng, L.E., Zhang, J. & Reed, R.R. The transcription factor Zfp423/OAZ is required for cerebellar development and CNS midline patterning. *Developmental Biology* **307(1)**, 43–52 (2007).
54. Warming, S., Rachel, R.A., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. Zfp423 Is Required for Normal Cerebellar Development. *Mol. Cell. Biol.* **26(18)**, 6913–6922 (2006).
55. Cheng, L.E. & Reed, R.R. Zfp423/OAZ Participates in a Developmental Switch during Olfactory Neurogenesis. *Neuron* **54(4)**, 547–557 (2007).
56. Masserdotti, G. *et al.* ZFP423 Coordinates Notch and Bone Morphogenetic Protein Signaling, Selectively Up-regulating Hes5 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **285(4)**, 30814–30824 (2010).
57. Huang, S. *et al.* ZNF423 Is Critically Required for Retinoic Acid-Induced Differentiation and Is a Marker of Neuroblastoma Outcome. *Cancer Cell* **15(4)**, 328–340 (2009).
58. Ku, M.-C., Stewart, S. & Hata, A. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with OAZ and regulates BMP-target genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311(3)**, 702–707 (2003).
59. Cho, Y.-W. *et al.* Zfp423 Binds Autoregulatory Sites in P19 Cell Culture Model. *PLOS ONE* **8(6)**, e66514 (2013).
60. Addison, W.N. *et al.* Direct Transcriptional Repression of Zfp423 by Zfp521 Mediates a Bone Morphogenic Protein-Dependent Osteoblast versus Adipocyte Lineage Commitment Switch. *Mol. Cell. Biol.* **34(16)**, 3076–3085 (2014).
61. Hölzel, M. *et al.* NF1 Is a Tumor Suppressor in Neuroblastoma that Determines Retinoic Acid Response and Disease Outcome. *Cell* **142(2)**, 218–229 (2010).
62. Morikawa, M. *et al.* ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucl. Acids Res.* **39(20)**, 8712–8727 (2011).
63. Warming, S., Suzuki, T., Yamaguchi, T.P., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. Early B-cell factor-associated zinc-finger gene is a frequent target of retroviral integration in murine B-cell lymphomas. *Oncogene* **23(15)**, 2727–2731 (2004).
64. Miyazaki, K. *et al.* Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* **113(19)**, 4702–4710 (2009).
65. BOSCHART, M. *et al.* A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521–530 (1985).
66. Teschendorf, C., Warrington, K.H., JR, Siemann, D.W. & Muzyczka, N. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer research* **22(6A)**, 3325–3330 (2002).
67. Johnson, P. & Friedmann, T. Limited bidirectional activity of two housekeeping gene promoters. Human HPRT and PGK. *Gene* **88**, 207–213 (1990).

68. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391(6669)**, 806–811 (1998).
69. Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **286(5441)**, 950–952 (1999).
70. Elbashir, S.M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411(6836)**, 494–498 (2001).
71. Barrangou, R. *et al.* Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucl. Acids Res.* **43**, 3407–3419 (2015).
72. Mandegar, M.A. *et al.* CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs. *Cell stem cell* **18**, 541–553 (2016).
73. Tang, G. siRNA and miRNA. An insight into RISCs. *Trends in biochemical sciences* **30**, 106–114 (2005).
74. Grimm, D. Small silencing RNAs. State-of-the-art. *Advanced drug delivery reviews* **61**, 672–703 (2009).
75. Grimm, D. *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537–541 (2006).
76. Jackson, A.L. *et al.* Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA (New York, N.Y.)* **12**, 1179–1187 (2006).
77. Aagaard, L. & Rossi, J.J. RNAi therapeutics. Principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews* **59**, 75–86 (2007).
78. Tseng, Y.-C., Mozumdar, S. & Huang, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Advanced drug delivery reviews* **61**, 721–731 (2009).
79. van de Water, F.M. *et al.* Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **34**, 1393–1397 (2006).
80. Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M.G. & Au, J.L.-S. Delivery of siRNA Therapeutics. Barriers and Carriers. *The AAPS Journal* **12**, 492–503 (2010).
81. Zimmermann, T.S. *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111–114 (2006).
82. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine* **11**, 50–55 (2005).

10 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Horstmann für die Aufgabenstellung und Supervision meiner experimentellen Arbeiten im Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Ann-Christin Puller, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in jeglichem Vorhaben tatkräftig unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Team des Forschungsinstituts Kinderkrebs-Zentrum Hamburg bedanken, insbesondere bei Dr. Ina-Katrin Siekmann und Julia Strauss sowie Dr. Marcos Seoane Souto und Dr. Pablo Iglesias Vázquez. Sie wiesen mich geduldig in neue Experimentalmethoden ein und hatten immer ein offenes Ohr für Fragen.

Vielen Dank an meine Freunde: Ihr habt mit mir die Höhen dieser Arbeit genossen und mich aus den Tiefen gezogen. Ich danke Euch auch für die fachliche Unterstützung, auf Euch kann ich zählen!

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner Familie. Ihr lehrtet mich, was Zusammenhalt und Durchhaltevermögen heißt. Besonders danke ich den besten Eltern der Welt! Was ihr alles auf euch genommen habt, damit es mir gut geht, keine Worte können das zum Ausdruck bringen, was Ihr mir bedeutet.

Zuletzt möchte ich mich bei Dir bedanken, Tanja, für die Geduld und Unterstützung die Du mitgebracht hast, ohne Dich hätte ich dieses Vorhaben wohl nie gemeistert. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft und danke Dir von ganzem Herzen!

11 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 Eidesstattliche Erklärung

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: