

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Untersuchung zur Funktion der Histonvariante H2AFB in Tumorzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lea Isabel Ohm
geboren am 11.07.1993 in Arolsen

Betreuer: apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. M. S. Staeger

Gutachter: apl. Prof. Dr. med. M. Kornhuber

PD Dr. B. Weigmann (Erlangen-Nürnberg)

03.09.2019
17.06.2020

Referat

Das Hodgkin-Lymphom ist eine maligne Erkrankung, die gleichwohl junge wie ältere Erwachsene betrifft. Mit einer sehr guten Überlebensprognose stellt es eine Sonderstellung unter den Malignomen dar. Dennoch sind die Langzeitfolgen der Krebstherapie insbesondere bei jungen Patienten nicht außer Acht zu lassen. Aus diesem Grund ist es von Interesse schonende Therapeutika zu entwickeln, die gezielte Ansatzpunkte in den Krebszellen nutzen.

H2AFB ist eine nicht-kanonische Histonvariante von H2A und wird in Hodgkin-Lymphomen erhöht exprimiert. Damit stellt H2AFB ein interessantes Forschungsobjekt für die Entwicklung neuer Therapieansätze des Hodgkin-Lymphoms und der Erforschung der Tumorphagenese dar.

In dieser Arbeit sollte die Histonvariante H2AFB in ihrer Funktion und Genwirkung genauer untersucht werden. Es wurde hierzu zunächst ein Screening durchgeführt, das die basale Expression von H2AFB in verschiedenen Zellen erfasste. Im nächsten Schritt wurden transgene Zellen erstellt und diese hinsichtlich ihres Zellzyklus und der Chemotherapie-Sensibilität untersucht. Da Humane Endogene Retroviren (HERV) eine Rolle in der Pathogenese vieler Tumoren zu spielen scheinen, wurde die Veränderung der Expression entsprechender HERV-Transkripte durch H2AFB überprüft. Außerdem wurde die Genexpression einer H2AFB-transgenen Zelllinie mit der Expression der unveränderten Zelllinie mithilfe von DNA-Microarrays verglichen.

Es zeigte sich, dass H2AFB vermehrt in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und im Hoden exprimiert wird, jedoch seine Expression auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender nicht gering ist. Hinsichtlich des Zellzyklus und der Chemotherapie-Resistenz gegenüber Cisplatin konnte keine Veränderung durch H2AFB festgestellt werden. Die Expression Endogener Retroviren scheint positiv mit der H2AFB Expression zu korrelieren. Es konnten außerdem einige Gene identifiziert werden, die durch H2AFB reguliert werden. H2AFB scheint dabei entgegen der Erwartung nicht rein transkriptionsfördernd zu sein.

Insgesamt konnte somit zwar kein Einfluss der Histonvariante auf Wachstum und Überleben der Tumorzellen unter Einwirkung von Cisplatin festgestellt werden, jedoch könnte H2AFB über die Regulation Zell-eigener Gene und Humaner Endogener Retroviren die Tumorphagenese beeinflussen.

Lea Isabel Ohm: Untersuchung zur Funktion der Histonvariante H2AFB in Tumorzellen, Halle (Saale), Univ. Med. Fak. Diss., 80 Seiten, 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Histonvariante H2AFB	1
1.1.1	Funktionen und Eigenschaften von Histonen	1
1.1.2	Die nicht-kanonische Histonvariante H2AFB	1
1.1.3	H2AFB als <i>cancer/testis</i> -Antigen	2
1.2	Das Hodgkin-Lymphom	2
1.2.1	Epidemiologie	3
1.2.2	Äthiologie und Risikofaktoren	3
1.2.3	Klinik	4
1.2.4	Diagnostik	4
1.2.5	Prognose und Therapie	5
1.3	Humane Endogene Retroviren	6
2	Zielsetzung	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Material	9
3.1.1	Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial	9
3.1.2	Primer	12
3.1.3	Software	12
3.2	Molekularbiologische Methoden	12
3.2.1	RNA-Isolation	12
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	13
3.2.3	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	13
3.2.4	Polymerasekettenreaktion	14
3.2.5	PCR-Produkt-Aufreinigung	15
3.2.6	Gelelektrophorese	15
3.2.7	Isolierung von DNA aus Argarosegel	16
3.2.8	Sequenzierung von Nukleinsäuren	16
3.2.9	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	17
3.2.10	<i>Microarray</i> -Analyse	19
3.3	Klonierungsmethoden	19
3.3.1	Vektorsynthese	19
3.4	Zellkultur	25
3.4.1	Einfrieren und Auftauen	26
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl	27
3.4.3	Transfektion	27

3.5	Zellexperimente	28
3.5.1	<i>Flourescence-activated cell sorting</i> (FACS)	28
3.5.2	Zellzyklusanalyse	28
3.5.3	Chemotherapeutika-Resistenz	29
3.5.4	Photographische Dokumentation	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Screening auf die Expression von H2AFB	31
4.2	Vektoren	32
4.3	Transgene Zellen	34
4.4	Untersuchung funktioneller Effekte transgener H2AFB-Expression	39
4.4.1	Zellzyklus	39
4.4.2	Chemotherapeutika-Resistenz	43
4.5	Untersuchung zur Genexpression H2AFB-transgener Zellen	46
4.5.1	Korrelation der Expression von H2AFB und (Humaner) Endogener Retroviren	46
4.5.2	<i>Microarray</i> -Analyse	53
5	Diskussion	57
5.1	Differentielle Expression von H2AFB in Tumorzellen	57
5.2	Nimmt H2AFB Einfluss auf den Zellzyklus maligner Zellen?	57
5.3	Nimmt H2AFB Einfluss auf die Chemotherapie-Sensibilität maligner Zellen?	59
5.4	H2AFB und endogene Retroviren	59
5.4.1	ERV3 und Apoptose in H2AFB-transgenen Zellen	61
5.5	Einfluss von H2AFB auf die Genexpression	61
6	Zusammenfassung	63
7	Literaturverzeichnis	65
8	Thesen	72
9	Anhang	73
9.1	Basensequenzen für Genvarianten H2AFB	73
9.2	Aminosäuresequenz für Proteinvarianten von H2AFB	74
9.3	Sequenzierung der HERV-K mittlere Bande der Gelelektrophorese	75
9.4	Korrelation von HERV und H2AFB: Punktdiagramme für HERV-F und-W	75
9.4.1	HERV-F und H2AFB	75
9.4.2	HERV-W und H2AFB	76
9.4.3	HERV-K und HERV-F	77
9.5	Daten der <i>heat-map</i>	78
9.6	<i>Microarray</i> -Daten	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Screening auf H2AFB
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pIRES2-AcGFPxH2AFB
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAcGFP1-N3xH2AFB
Abbildung 4	Expression von H2AFB nach Überexpression in A673- und L428-Zellen
Abbildung 5	pAcGFP1-N3-Leervektor-transgene A673-Zellen nach Selektion
Abbildung 6	H2B-GFP-transgene A673-Zellen: Zellkernfärbung und Chromosomenfärbung in der Anaphase
Abbildung 7	H2B-GFP-transgene A673-Zellen: Chromosomenfärbung
Abbildung 8	H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen nach Selektion
Abbildung 9	H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen: Mitose
Abbildung 10	H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen: Färbung mit Höchst-Farbstoff
Abbildung 11	pAcGFP1-N3-Leervektor-transgene L428-Zellen
Abbildung 12	H2B-GFP-transgene L428-Zellen
Abbildung 13	H2AFB-GFP-transgene L428-Zellen
Abbildung 14	Beispiel für die Auswertung der Zellzyklusanalyse mit Modfit
Abbildung 15	Beispiel für die Auswertung der Zellzyklusanalyse mit Cellquest Pro
Abbildung 16	Zellzyklusanalyse A673
Abbildung 17	Zellzyklusanalyse L428
Abbildung 18	Gatingstrategie: Anteil der grünen, lebenden unter allen grünen Zellen
Abbildung 19	Gatingstrategie: Anteil der grünen, lebenden unter allen Zellen
Abbildung 20	Chemotherapie-Resistenz von A673-Zellen
Abbildung 21	Chemotherapie-Resistenz von L428-Zellen
Abbildung 22	HERV-K und H2AFB in Hodgkin-Lymphom-Zellen
Abbildung 23	HERV-K und H2AFB in HL-Zellen und transgenen L428-Zellen
Abbildung 24	HERV-K und H2AFB in transgenen A673-Zellen
Abbildung 25	Gelelektrophorese mit HERV-K, -F, -W
Abbildung 26	HERV-K1 und H2AFB in transgenen A673- und L428-Zellen
Abbildung 27	ERV3 und H2AFB in transgenen A673- und L428-Zellen

Abbildung 28	Viabilität transgener Zellen
Abbildung 29	<i>heat-map</i> (Exon-Probesets) zur differentiellen Genexpression durch H2AFB
Abbildung 30	PLOD2 und H2AFB in A673-Zellen
Abbildung 31	PDCD4 und H2AFB in A673-Zellen
Abbildung 32	Sequenzierung HERV-K
Abbildung 33	HERV-F und H2AFB in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen
Abbildung 34	HERV-F und H2AFB in transgenen A673-Zellen
Abbildung 35	HERV-W und H2AFB in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen
Abbildung 36	HERV-W und H2AFB in transgenen A673-Zellen
Abbildung 37	HERV-K und -F in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen
Abbildung 38	HERV-K und -F in transgenen A673-Zellen
Abbildung 39	<i>Microarray</i> -Datenbank zu PLOD2 und H2AFB
Abbildung 40	PLOD2 und H2AFB in transgenen A673-Zellen
Abbildung 41	<i>Microarray</i> -Datenbank zu PDCD4 und H2AFB
Abbildung 42	PDCD4 und H2AFB in transgenen A673-Zellen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über verwendete Geräte, Reagenzien und Materialien
Tabelle 2	Übersicht über verwendete Primer
Tabelle 3	Primerkombinationen
Tabelle 4	Software
Tabelle 5	Pipettierschema „cDNA“
Tabelle 6	Konditionen für cDNA-Synthese im Thermocycler
Tabelle 7	Pipettierschema „PCR“
Tabelle 8	PCR-Programm „Standard“
Tabelle 9	PCR-Programm „Primer mit Schnittstelle“
Tabelle 10	Pipettierschema „DNA-Leiter“
Tabelle 11	Pipettierschema „Sequenzierung“
Tabelle 12	PCR-Programm „Sequenzierung“
Tabelle 13	Pipettierschema „qRT-PCR“
Tabelle 14	qRT-PCR-Programm
Tabelle 15	Pipettierschema „Ligation pGEM-T Easy“
Tabelle 16	Pipettierschema „Restriktionsverdau“
Tabelle 17	Pipettierschema „Dephosphorylierung“

Tabelle 18	Pipettierschema „Ligation Expressionsvektoren“
Tabelle 19	Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation von HERV-K, -F und -W mit H2AFB
Tabelle 20	Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation zwischen HERV-K und -F
Tabelle 21	Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation von HERV-K1 und ERV3 mit H2AFB

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AcGFP	<i>Aequorea coerulescens green fluorescent protein</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
AG	Arbeitsgruppe
B-ALL	B-Zell-ALL inklusive leukämischer Manifestation des Burkitt-Lymphoms
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
Co-	zusammen (mit anderen)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	<i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
env	<i>envelope</i>

ERV	Endogenes Retrovirus
et al.	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FL2-A	Fluoreszenz-2-area
FL2-W	Fluoreszenz-2-width
FL3-Pi	Fluoreszenz-3-Propidiumiodid
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
g (x g)	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gy	Gray (Energiedosis für ionisierende Strahlung)
H ₂ O	Wasser
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
KHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
l	Liter
m	Milli
M	Molar
MEF	<i>mouse embryo fibroblast</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaOAc	Natriumacetat
NLPHL	Noduläres Lymphozyten-Prädominantes Hodgkin-Lymphom
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Pi	Propidiumiodid
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RPE	pigmentierte Retina-Epithelzellen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RT	<i>real-time</i>
SSC	<i>side scatter</i>

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ	<i>micro</i>
Δ	<i>delta</i>
>	größer als
<	kleiner als

1 Einleitung

1.1 Die Histonvariante H2AFB

1.1.1 Funktion und Eigenschaften von Histonen

Histone sind basische Proteine, welche das Genom der meisten eukaryotischen Zellen verpacken, verdichten und gleichzeitig zugänglich für Enzyme der Transkription und Replikation machen. Histone formen mit der DNA sogenannte Nukleosomen. Diese werden aus einem Oktamer aus jeweils zwei Kern-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und etwa 147 bp DNA gebildet (Luger *et al.*, 1997; Talbert und Henikoff, 2010). Das Oktamer besteht aus einem (H3-H4)²-Heterotetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren. Außerdem gibt es ein Linker-Histon H1, welches die DNA zwischen zwei Nukleosomen bindet (Ramakrishnan, 1997).

Die vier Kern-Histone besitzen eine Histon-Faltungs-Domäne, welche aus drei Alpha-Helices getrennt durch zwei Loops besteht (Arents und Moudrianakis, 1993, 1995; Chadwick und Willard, 2001). In einem Nukleosom liegen die Histon-Faltungsdomänen von jeweils zwei Histonen (H2A und H2B, H3 und H4) antiparallel zusammen (Luger *et al.*, 1997; Talbert und Henikoff, 2010). Neben den vier gehäuft vorkommenden, sogenannten kanonischen Histonen gibt es auch Varianten von diesen. Während kanonischen Histonen vor allem Aufgaben in der DNA-Verpackung und Genregulation zugeschrieben werden, scheinen die nicht-kanonische Histone Rolle in einer Reihe von Prozessen, wie DNA-Reparatur, Gonosomen-Kondensation und Chromatin-Verpackung in Spermien zu spielen. Die Gene der kanonischen Histone liegen geclustert im Genom vor. Ihre Expression ist an die DNA-Replikation gekoppelt. Gene für nicht-kanonische Histone sind häufig allein im Genom zu finden und werden konstitutiv exprimiert (Zlatanova *et al.*, 2009; Talbert und Henikoff, 2010).

1.1.2 Die nicht-kanonische Histonvariante H2AFB

H2AFB ist eine nicht-kanonische Variante des Histons H2A. H2AFB wurde 2001 von Chadwick und Willard entdeckt und aufgrund seiner Eigenschaft nicht im menschlichen Barr-Körperchen vorhanden zu sein als H2ABbd (H2A *Barr body-deficient*) bezeichnet (Chadwick und Willard, 2001). Es hat nur 48% Sequenz-Übereinstimmung mit der kanonischen Form von H2A und ist dabei kürzer als diese Variante. H2AFB fehlen insbesondere Sequenzen, die bei H2A der posttranslationalen Modifikationen des Proteins, wie Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitierung, dienen. H2AFB scheint daher anders reguliert zu sein als H2A (Chadwick und Willard, 2001; Eirin-Lopez *et al.*, 2008). Die größte Sequenz-Übereinstimmung mit H2A ist in den alpha-Helices der Histon-Faltungs-Domäne zu finden, welche wichtig für Protein-Protein- und

Protein-DNA-Interaktion in Nukleosomen sind (Ichimura *et al.*, 1982; Arents und Moudrianakis, 1993, 1995; Luger *et al.*, 1997; Luger und Richmond, 1998; Chadwick und Willard, 2001). Aufgrund der Ähnlichkeit in der Faltungs-Domäne könnte es H2A in Nukleosomen ersetzen (Chadwick und Willard, 2001). Von H2AFB liegen drei intronlose Kopien auf Xq28 vor (Naylor *et al.*, 1995; Chadwick und Willard, 2001). Es ist in der Inter- und Metaphase nicht im inaktiven X-Chromosom, aber sowohl im aktiven X, als auch in Autosomen, nachweisbar. Des Weiteren scheint H2AFB mit acetyliertem H4 assoziiert zu sein. Acetylierung von H3 und H4 führt zur Destabilisierung von Chromatin und bietet so Zugang für Enzyme der Transkription und Replikation. Dies spricht beides für eine Assoziation von H2AFB mit transkriptionell aktivem Chromatin (Spencer und Davie, 1999; Wolffe und Hayes, 1999; Chadwick und Willard, 2001). Außerdem besitzt H2AFB einen kleineren „acidic patch“ als H2A, was die Faltung der Nukleosomen behindern und so die Inhibition der Transkription reduzieren könnte (Zhou *et al.*, 2007; Talbert und Henikoff, 2010).

Im Vergleich dazu ist MakroH2A, eine weitere nicht-kanonische Variante von H2A mit 60% Sequenz-Übereinstimmung, bevorzugt im inaktiven X-Chromosom zu finden (Pehrson und Fried, 1992; Costanzi und Pehrson, 1998; Chadwick und Willard, 2001). H2AFB könnte im Austausch mit H2A die Form von Nukleosomen verändern und den Zugang für H2AFB-abhängige Enzyme zur DNA schaffen. Des Weiteren wird die Exklusion von H2AFB bei der Inaktivierung von X-Chromosomen diskutiert (Chadwick und Willard, 2001).

1.1.3 H2AFB als *cancer/testis*-Antigen

Cancer/testis-Antigene sind Antigene, welche in männlichen Keimzellen, teilweise im Ovar und im Trophoblasten, exprimiert werden, wobei sie physiologisch nicht in somatischen Zellen vorkommen. Die Expression dieser Gene kann daneben in karzinomatös veränderten Zellen nachgewiesen werden (Scanlan *et al.*, 2002). H2AFB wurden von Winkler *et al.* als ein solches *cancer/testis*-Antigen im Hodgkin-Lymphom beschrieben (Winkler *et al.*, 2012).

1.2 Das Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom (HL), auch Morbus Hodgkin und Lymphogranulomatose genannt, gehört zu den malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems (Herold, 2014). Es entsteht aus einer B-Zell-Neoplasie oder, in seltenen Fällen, aus einer T-Zell-Neoplasie im Lymphknoten (Küppers *et al.*, 1994; Müschen *et al.*, 2000).

Das Hodgkin-Lymphom wird untergliedert in das seltenere Noduläre Lymphozyten-Prädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL) und das Klassische Hodgkin-Lymphom

(KHL), wobei letzteres in Nodulär Sklesorierendes KHL, Lymphozytenreiches KHL, Gemischt-Zelluläres KHL und Lymphozytenarmes KHL unterteilt wird (Gobbi *et al.*, 2013).

1.2.1 Epidemiologie

Das Hodgkin-Lymphom ist eine seltene Erkrankung. In Deutschland liegt das Risiko für einen Menschen im Laufe seines Lebens daran zu erkranken bei etwa 0,2%. Es hat mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 83% für Frauen und 80% für Männer im Jahr 2012 in Deutschland zudem eine ausgesprochen gute Prognose (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015).

Weltweit lag die Inzidenz für das Hodgkin-Lymphom im Jahr 2012 bei 1,1/100.000 für Männer und 0,7/100.000 für Frauen. In Industrieländern ist sie höher als in Entwicklungsländern. Insgesamt macht das Hodgkin-Lymphom etwa 0,5% der krebsbedingten Todesfälle weltweit aus (Ferlay *et al.*, 2015). In den Industrieländern tritt das Hodgkin-Lymphom, anders als die meisten Krebserkrankungen, mit zwei Häufigkeitsgipfeln auf. Der erste Häufigkeitsgipfel befindet sich im Jugendlichen- bzw. jungen Erwachsenenalter zwischen 15 und 29 Jahren, der zweite ist zwischen dem 70. und 84. Lebensjahr zu finden, wobei die Inzidenz vom 55. bis zum 84. Lebensjahr stetig steigt (National Cancer Institute, 2015). Ältere Patienten haben häufig eine schlechtere Prognose als jüngere (Punnett *et al.*, 2010).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms konnte nach dem heutigen Wissenstand noch nicht hinreichend geklärt werden. Diskutiert werden genetische Faktoren, Umwelteinflüsse, Lebensstil und sozio-ökonomische Einflüsse wie Bildung und Einkommen (Roswall *et al.*, 2008; Maggioncalda *et al.*, 2011). Als Ursache der zwei Häufigkeitsgipfel in der Altersverteilung werden Besonderheiten im Immunsystem diskutiert. So wird unter anderem eine Immununreife bei kindlichem HL und –dysregulation bei älteren Betroffenen für eine erhöhte Häufigkeit verantwortlich gemacht (Punnett *et al.*, 2010). Weitere Risikofaktoren sind Immunschwäche bei Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), einer immunsuppressiven Therapie bei Transplantationspatienten, sowie Autoimmunerkrankungen (Rowlings *et al.*, 1999; Landgren *et al.*, 2006; Punnett *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2013). Die Infektion mit onkogenen Viren, wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV), scheint zumindest bei einigen der Hodgkin-Lymphom-Entitäten eine Rolle als Risikofaktor zu spielen (Glaser *et al.*, 1997). So konnte in etwa 20-50% der Hodgkin-Lymphome in Nordamerika und Europa EBV-DNA nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 1990; Herbst *et al.*, 1992; Kapatai *et al.*, 2007).

In Entwicklungsländern waren es sogar noch höhere Raten (Chang *et al.*, 1993; Weinreb *et al.*, 1996; Kapatai *et al.*, 2007).

1.2.3 Klinik

Die meisten Hodgkin-Lymphom-Patienten zeigen bis zur Diagnosestellung wenige bis keine Symptome, sodass die pathologische Lymphknotenschwellung häufig als Nebenbefund diagnostiziert wird. In den meisten Fällen befindet sich diese supradiaphragmatisch in Lymphknotenstationen am Hals oder unter dem Arm. In selteneren Fällen sind jedoch auch infradiaphragmatische Gebiete, wie die inguinalen Lymphknotenstationen betroffen. Abdominale Lymphknotenstationen sind eher bei älteren Patienten involviert (Gobbi *et al.*, 2013). Auch der Waldeyer-Rachenring kann betroffen sein. Bei etwa einem Drittel der Patienten zeigt sich eine so genannte B-Symptomatik bestehend aus Nachtschweiß, Fieber über 38°C und Gewichtsabnahme von mehr als 10% in 6 Monaten. Diese ist häufig mit einer fortgeschrittenen Erkrankung verbunden. Einige Patienten klagen zudem über chronischen Juckreiz und Schmerzen nach Alkoholenuss. Über den hämatogenen Metastasierungsweg befällt das Hodgkin-Lymphom bevorzugt die Milz, Lunge, Leber und Knochenmark (Gobbi *et al.*, 2013; Ansell, 2014). In fortgeschrittenen Stadien kann es zu verdrängendem Wachstum und Kompressionen benachbarter Organe kommen. So können unspezifische Symptome wie Luftnot und Husten oder Oberbauchbeschwerden hinzukommen. Bei starkem Tumorwachstum im Halsbereich kann es zum Vena-Cava-Superior-Syndrom kommen. Außerdem können durch Kompressionen im Spinalkanal und im Gehirn neurologische Ausfälle entstehen (Gobbi *et al.*, 2013). Aufgrund des Befalls des Lymphsystems kommt es häufig zu einer Lymphozytopenie mit einer Eosinophilie, was mit einer Immunschwäche und Infektanfälligkeit einhergeht. Häufig liegt auch eine Anämie vor (Baharvand und Mortazavi, 2014).

1.2.4 Diagnostik

Nach ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung und Labordiagnostik kann die sichere Diagnose Hodgkin-Lymphom nur durch die Entnahme eines oder mehrerer auffälliger Lymphknoten gestellt werden. In Abgrenzung zu infektbedingten Lymphknotenschwellungen zeigen sich maligne als derbe, indolent und häufig schlechter verschieblich. Wichtig für die Diagnosestellung ist die komplette Exstirpation eines Lymphknotens vor Therapiebeginn, da maligne Zellen nur einen sehr geringen Anteil der Zellen des Lymphknotens ausmachen (Ansell, 2014). In der Histologie der Präparate zeigen sich die für das Hodgkin-Lymphom pathognomonischen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen. Diese bestehen aus den mehrkernigen Sternberg-Riesenzellen

und den einkernigen Hodgkin-Zellen und sind mit Ausnahme des NLPHL CD30- und CD15-positiv (Ansell, 2014; Herold G, 2014). Anschließend erfolgt das *Staging* anhand der Ann-Arbor-Klassifikation. Dieses beinhaltet Anzahl und Lokalisation befallener Lymphknotenregionen, extranodaler beziehungsweise extralymphatischer Befall und das Vorhandensein von B-Symptomatik (Lister *et al.*, 1989; Ansell, 2014). Die Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) scheint hierbei sensitiver für *Staging* vor und *Re-Staging* nach Therapiebeginn zu sein als die Computer-Tomographie (CT) (Wirth *et al.*, 2002). Das genaue *Staging* ist zur Zeit der wichtigste Parameter für die Auswahl der angemessenen Therapie.

1.2.5 Prognose und Therapie

Mehr als 80% der neu diagnostizierten HL-Patienten unter 60 Jahren können durch heutige Therapie geheilt werden (Ansell, 2014). Aus diesem Grund und aufgrund des häufig jungen Alters der Betroffenen müssen insbesondere die Langzeitfolgen der Hodgkin-Lymphom-Therapie beachtet werden. Daher haben sich bereits Strategien etabliert, um Risikogruppen zu identifizieren und Unter- sowie Übertherapie zu verhindern. Langzeitfolgen der Therapie stellen vor allem kardiopulmonale Schäden und Zweitmalignome dar (Ng *et al.*, 2002). Faktoren die für einen schlechteren Krankheitsverlauf sprechen sind unter anderem männliches Geschlecht, höheres Alter, hohes *Staging*-Stadium nach Ann-Arbor und Auffälligkeiten in Laborparametern (Hasenclever *et al.*, 1998). Nach Betrachtung dieser und weiterer Risikofaktoren, sowie der Histologie, können Patienten im frühen und solche im fortgeschrittenen Krankheitsstadium unterschieden werden und ihr Risiko kalkuliert werden. Der Therapieansatz ist in der Regel für alle kurativ. Patienten mit klassischem Hodgkin-Lymphom in einem frühen Krankheitsstadium werden nach dem ABVD-Schema bestehend aus den Chemotherapeutika Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin und *involved-field* Strahlentherapie mit 20-30 Gy behandelt. Solche mit fortgeschrittenem Stadium werden in der Regel nach dem BEACOPP-Schema (Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazine und Prednisolon) behandelt. Hiervon zu unterscheiden ist das seltenere Noduläre Lymphozyten-Prädominante Hodgkin-Lymphom, welches im frühen Stadium nach Entfernung der betroffenen Lymphknoten lediglich durch Bestrahlung therapiert wird und im fortgeschrittenen Stadium nach ABVD-Schema häufig in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Bei einem Rezidiv stellt die Hoch-Dosis-Chemotherapie in Kombination mit einer autologen Stammzell-Transplantation das Mittel der Wahl dar (Ansell, 2014). In neueren Therapieansätzen wird der CD20-Antikörper Rituximab auch bei einem Rezidiv des Klassischen Hodgkin-Lymphoms in Kombination zur

Chemotherapie eingesetzt. Rituximab soll die CD20-negativen HRS-Zellen über die Schädigung der B-Lymphozyten schwächen (Oki und Younes, 2010). Einen weiteren neuen Ansatz stellt das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Brentuximab dar. Brentuximab Vedotin ist ein Konjugat aus einem monoklonalen Antikörper gegen CD30 und dem Zytostatikum Monomethylauristatin E (Gobbi *et al.*, 2013). Weitere Ansätze sind unter anderem Nivolumab und Pembrolizumab, monoklonale Antikörper gegen PD1 oder PDL1, einem Checkpoint-Protein in T-Lymphozyten, welche die Krebszellen über Reaktivierung der T-Lymphozyten angreifen und Mocetinostat, ein Histonacetylasen-Inhibitor, mit zusätzlichen immunmodulatorischen Effekten (Stathis und Younes, 2015).

1.3 Humane Endogene Retroviren

Endogene Retroviren (ERV) im humanen Genom sind Überbleibsel von Exogenen Retroviren, welche etwa vor 35 bis 45 Millionen Jahren Keimzellen von Primaten befallen haben und in das Genom der Zelle eingebaut wurden (Hughes und Coffin, 2005). Ihre DNA-Sequenzen liegen in vielfachen Kopien vor und machen etwa 8% des menschlichen Genoms aus (Lander *et al.*, 2001). ERVs teilen sich mit allen anderen Retroviren einen ähnlichen genetischen Aufbau. Dieser besteht aus den Genen gag (Gruppen-spezifisches Antigen), pro und pol (virale Enzyme, insbesondere die reverse Transkriptase), env (Hüllprotein) und 2 LTRs (*long-terminal-repeats*) (Kassiotis, 2014). Mit Hilfe der reversen Transkriptase besitzen Humane Endogene Retroviren (HERV) die Möglichkeit der Retrotransposition im Genom (Dewannieux und Heidmann, 2013). Transkripte von Humanen Endogenen Retroviren konnten bereits in einer Reihe von Tumorentitäten nachgewiesen werden (Ruprecht *et al.*, 2008). Welchen Einfluss sie auf die Krebsentstehung nehmen ist daher Gegenstand heutiger Forschung. Diskutiert werden verschiedene Wirkungen auf die Genomfunktion und Tumorphagenese. Ein Beispiel für die Wirkung eines HERV-Proteins auf die Tumorentstehung ist das Protein Rec. Rec entsteht durch alternatives *Splicing* aus einem HERV-K *envelope* Gen und interagiert mit dem zellulären Transkriptionsfaktor PLZF (*promyelocytic leukemia zinc-finger-protein*) (Kassiotis, 2014). Im Maus-Experiment führt die Überexpression von Rec zu Seminomen (Galli *et al.*, 2005). Über PSF (*polypyrimidine tract-binding protein associated splicing factor*) haben HERV-Sequenzen auch indirekt regulatorischen Einfluss auf die Tumorgenese. PSF ist ein Faktor, der einige Proto-Onkogene im Menschen hemmt (Li *et al.*, 2009). Die PSF-Aktivität ist durch das Binden von bestimmter nicht-kodierender RNA, wie HERV-K11, negativ reguliert. Über diesen Mechanismus kann nicht-kodierende HERV-RNA die Expression von Proto-Onkogene fördern (Kassiotis, 2014). Durch Interaktion mit dem Immunsystem nehmen HERV-

Sequenzen außerdem Einfluss auf das Überleben von Tumorzellen (Ruprecht *et al.*, 2008). Diskutiert wird auch die Transformation menschlicher Zellen durch Insertionsmutagenese (Kassiotis, 2014). Durch Retrotransposition der HERV-Sequenzen könnten Gene beeinflusst werden und zum Beispiel Tumorsuppressorgene gestört oder Onkogene aktiviert werden.

Der Einfluss endogener Retroviren auf die menschliche Zelle scheint jedoch nicht rein pathologisch zu sein. So werden ihnen wichtige Aufgaben in der Evolution des menschlichen Genoms zugeschrieben (Griffiths, 2001). Ein Beispiel für die Übernahme physiologischer Aufgaben im menschlichen Organismus sind die mit retroviralen *env* Genen verwandten Syncytine. Syncytine spielen bei der Plazentaentwicklung eine wichtige Rolle und nehmen teilweise durch immunsuppressive Wirkung eine wichtige Rolle für die maternale Toleranz des Fetus in der Schwangerschaft ein (Dupressoir *et al.*, 2012).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Expression der meisten HERV-Sequenzen aktiv durch die Zelle unterdrückt (Dewannieux und Heidmann, 2013). So scheint es beispielsweise in undifferenzierten Zellen, wie pluripotenten Stammzellen, einen Mechanismus zu geben, der die Expression von endogenen retroviralen Sequenzen blockiert (Niwa *et al.*, 1983). Durch Faktoren wie Stress oder Chemikalien kann die Expression jedoch induziert werden. Die Regulation scheint dabei hauptsächlich durch die Modifikation des Chromatins, wie DNA- oder Histon-Methylierung oder Histon-Deacetylierung, zu erfolgen (Dewannieux und Heidmann, 2013).

Sequenzen endogener Retroviren nehmen also in vielerlei Hinsicht Einfluss auf die menschliche Zelle und sind über komplexe teilweise noch unbekannte Mechanismen reguliert. Da sie vermehrt in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden können und über diverse Mechanismen Einfluss auf Tumore nehmen, sind sie insbesondere für die Entwicklung neuer Therapieansätze von Interesse (Kassiotis, 2014). H2AFB könnte hierbei als nicht-kanonische Histonvariante und *cancer/testis*-Antigen regulatorischen Einfluss auf die Expression dieser Gene übernehmen.

2 Zielsetzung

Um die Besonderheiten des Hodgkin-Lymphoms in seinen unterschiedlichen Entitäten zu verstehen und um neue effiziente Therapieansätze zu entwickeln ist die Untersuchung HL-typischer Proteine von besonderem Interesse. Hierbei gilt es zunächst zu untersuchen, wie diese Proteine die Zelle beeinflussen können und ob sie beispielsweise Einfluss auf Zellzyklus, Apoptose und Überleben unter Therapie nehmen. Auf diese Weise könnten auch Angriffsstellen zukünftiger Therapieansätze identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Hodgkin-Lymphom-typischen Histonvariante H2AFB zu untersuchen. Hierbei interessierte auch, ob diese sich in unterschiedlichen Tumorzellen unterscheidet. Daher sollte zunächst geklärt werden, wie die Höhe der Expression von H2AFB in verschiedenen Zellenarten variiert. Die von Staeger *et al.* publizierten Unterschiede in der Chemotherapie-Sensibilität der HL-Zelllinien warfen dann die Frage auf, ob diese mit der Expression des HL-typischen Histons H2AFB assoziiert sein könnte (Staeger *et al.*, 2008). Zudem sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von H2AFB Einfluss auf die Chemotherapie-Sensibilität nimmt. Die Auswirkung von H2AFB auf Stoffwechsel und Vermehrung von Tumorzellen sollte anhand des Zellzyklus untersucht werden.

Da Histonen Aufgaben der Genregulation zugeschrieben werden und H2AFB mit lockerem, transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert zu sein scheint, sollte die Veränderung der Genexpression durch H2AFB untersucht werden (Chadwick und Willard, 2001; Talbert und Henikoff, 2010). Hierbei waren auch die häufig Tumor-assoziierten (Humanen) Endogenen Retroviren von Interesse (Ruprecht *et al.*, 2008).

Durch diese Untersuchungen sollte überprüft werden, ob es einen Einfluss von H2AFB auf die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms und anderer Tumorzellen gibt und ob dieses als Ansatzpunkt künftiger Therapieansätze in Betracht gezogen werden könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Die folgenden Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden für die experimentelle Arbeit genutzt.

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Geräte, Reagenzien und Materialien

Geräte:	Hersteller:
Brutschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Einfriercontainer Mr. Frosty TM	Nalgene <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Elektroporationsgerät	Lonza (Basel, Schweiz)
FACScan	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, USA)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert25 mit AxioCam colour	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Gelkamm	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Gelschlitten	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Imer Quantum ST5	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Kühlkombination (7°C/-20°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank (-80°C)	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Kühltruhe (-80°C)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mastercycler personal und gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Multifuge TM 1 S-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Laborfachhandel Schubert (Leipzig, Deutschland)
Photometer	Beckman Instruments (Brea, USA)
Pipetboy Accujet®	Brand (Wertheim, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
RotorGene RG-300	Corbett Research (Sydney, Australia)
RotorGene Q	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Schüttler mit Inkubationshaube	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
Serologische Einmalpipette	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Spannungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank Hera Safe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Biofuge frescoTM	Heraeus (Hanau, Deutschland)
UV-Illuminator	Biotec Fischer (Reiskirchen, Deutschland)
Vortex Genie® 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage	Sartorius (Göttingen)

Chemikalien/Lösungen:	
Ampicillin	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Aqua B. Braun	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Blastizidin	Roth Industries (Buchenau, Deutschland)
Canamycin	Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Cysplatin	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
DEPC-Wasser	Ambion <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Desinfektionsmittel Bacillol® AF	Hartmann (Heidenheim an der Brenz, Deutschland)
Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's PBS (DPBS)	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (96%)	Roth Industries (Buchenau, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Ambion <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
G418	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hoechst-Farbstoff 33258	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
HPLC-Wasser	Invitrogen <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
LB-Medium	Roth Industries (Buchenau, Deutschland)
Natriumacetat (NaOAc)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Opti-MEM Medium	Gibco <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Rnase Zap	Ambion <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
SOB-Medium	Roth Industries (Buchenau, Deutschland)
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Eigenherstellung Labor
Triton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin-EDTA 10fach Konzentrat	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Tryptanblau	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Universalagarose	PEQLab (Erlangen, Deutschland)
Zellkulturmedium Dulbocco'sMEM (DMEM)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Zellkulturmedium RPMI 1640	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Reaktionskits/fertige Lösungen:	
BigDye Terminator v1.1 Applied Biosystems TM	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Cell Line Nucleofector® Kit L Amaxa®	Lonza (Basel, Schweiz)
GeneJet Gel Extraktion Kit	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Genejet Plasmid Midiprep Kit	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Genejet Plasmid Miniprep Kit	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)

Gene Matrix Universal RNA Purification Kit	Roboklon (Berlin, Deutschland)
Gel & PCR Clean up Nucleo Spin®	Machery-Nagel (Berlin, Deutschland)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche (Basel, Schweiz)
PromoFectin Transfection Reagent PromoKine	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
qScript cDNA Supermix	QuantaBio (Beverly, USA)
Größenstandards:	
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Leiter	Invitrogen <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler™ 1 kbp DNA Leiter	Invitrogen <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Vektoren:	
pAcGFP1-N3	Clontech (Mountain View, USA)
pBOSH2B-GFP	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, USA)
pGEM-T Easy	Promega (Madison, USA)
pIRES-ACGFP	Clontech (Mountain View, USA)
Microarrays	
Human Transcriptome 2.0	Affymetrix <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Verbrauchsmaterialien:	
Einmalhandschuhe Micro-Touch	Ansell (Richmond, Australien)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Kryo-Röhrchen	Nalgene Nunc International <i>jetzt</i> ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen mit Filter	Biozyme (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Skalpell	Mediware (Lenexa, USA)
Tubes	Laborfachhandel Schubert (Leipzig, Deutschland)
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturplatten TPP	Sigma-Aldrich <i>jetzt</i> Merck (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifugengefäß	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Die verwendeten Enzyme und zugehörige Puffer wurden im Abschnitt Methoden angegeben.

3.1.2 Primer

Für die Experimente wurde folgende Primer und Primerkombinationen verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Primer

Name	Primersequenz: 5' → 3' -Richtung
H2AFB_left_klon	CCGAGATAGCACACTCAACG
H2AFB1-3_left_klon	ATGCCGAGGAGGAGGAGAC
H2AFB13_right	CAGAATTAATGAAGGCCCAAG
H2AFB_for_EcoRI	AAAGAATCCATGCCGAGGAGGA
H2AFB_rev_BamHI	TTTGGATCCGTCCTCGCCA
H2AFB_RT_120bp_for	CGAGCGGAGCTTTCGTTT
H2AFB_RT_120bp_rev	TCAGGTAATAAACCAGCAG
HPRT1_RT_190bp_for	ACCAGTCAACAGGGGACATAA

HPRT1_RT_190bp_rev	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC
HERV-K_for	GGCCATCAGAGTCTAAACCACG
HERV-K_rev	CTGACTTTCTGGGGGTGGCCG
HERV-F_for	CCTCCAGTCACAACAACCTC
HERV-F_rev	TATTGAAGAAGGCGGCTGG
HERV-W_for	TGAGTCAATTCTCATACCTG
HERV-W_rev	AGTTAAGAGTTCTTGGGTGG
ERV3_for	GGG AGT ATG CGG AAA GTT CA
ERV3_rev	CTC CAA GGG ATG AGA ACC AA
PRODH_for	GAAGCCTCAGGTAGAGTCAGC
PRODH_rev	C TTGCTCCACAGCCATTTG
HERV-K1_for	GCTTGTGTTTCACCAGGAG
HERV-K1_rev	TAATTTACCCGTGGCCTGAG
HERV-K2_for	CTGCAGTCCAAAATTGGTT
HERV-K2_rev	GCAATGCAACTCCTGCTACA
HERV-K3_for	TCTGCTGGTGAGAGCAAGA
HERV-K3_rev	TGGACACAGCACATGTTTCA
PLOD2_rt_rev	TTATTGAGCAACCAACCCCTTT
PLOD2_rt_for	GGCTTCCGCTTGACTTAGATTT
PDCD4_rt_for	ACAGGTGTATGATGTGGAGGA
PDCD4_rt_rev	TTCTCAAATGCCCTTTCATCCAA

Tabelle 3: Primerkombinationen

Name	Zielsequenz; Produkt
H2AFB1-3_left_klon + H2AFB13_right	H2AFB1/2/3; 487 bp
H2AFB_for_EcoRI + H2AFB_rev_BamHI	H2AFB1/2/3; 345 bp
H2AFB1-3_left_klon + H2AFB_rev_BamHI	H2AFB1/2/3; 344 bp
H2AFB_left_klon + H2AFB_rev_BamHI	H2AFB2; 370 bp

3.1.3 Software

Im Folgenden ist die verwendete Software genannt.

Tabelle 4: Software

Name	Hersteller
CellQuest™ Pro	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, USA)
Expression Console Affimetrix	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Modfit Lt™	Verity Software House (Topsham (Maine), USA)
NCBI blast	NCBI (Bethesda MD, USA)
Snappene	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)
SPSS	IBM (New York, USA)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Vor der Arbeit mit Ribonukleinsäuren wurden Geräte und Oberflächen mit RNase Zap gereinigt, um vorhandene RNasen zu entfernen.

Initial erfolgte die RNA-Isolation zur Gewinnung der Nukleinsäuresequenz H2AFB und

zum Screening auf H2AFB aus den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, HDML-2 und KMH-2 aus bereits vorhandenen Zellkulturen der Arbeitsgruppe. Die Zellen wurden vollständig geerntet, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 12000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das überständige Medium wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend mit dem Gene Matrix Universal RNA Purification Kit von Roboklon nach Protokoll des Herstellers behandelt und die RNA so isoliert. Die RNA wurde hierbei stets auf Eis gestellt und nach allen Schritten bei -80 °C gelagert.

Spätere RNA-Isolationen erfolgten mit einer geringeren Anzahl an Zellen und konnten so mit dem High Pure RNA Isolation Kit von Roche nach Protokoll des Herstellers durchgeführt werden.

Anschließend wurden die RNA-Konzentration und die Reinheit der Proben photometrisch bestimmt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit dem UV-Spektrophotometer kann der Nukleinsäuregehalt einer Probe mittels UV-Licht über die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bestimmt werden. Die Proben wurden hierzu 1:100 bzw 1:50 mit Wasser verdünnt, in die Küvette gegeben und mithilfe des Photometers die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis der Werte ließ sich zudem die Reinheit der Probe bestimmen. Diese sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

3.2.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Um aus der gewonnenen RNA komplementäre DNA herzustellen, wurde das Kit qScript cDNA Supermix von Quanta Bioscience verwendet. Alle Substanzen wurden auf Eis in cDNA-Tubes pipettiert, vermischt und kurz zentrifugiert (Tab. 5).

Tabelle 5: Pipettierschema „cDNA“

Menge	Komponente	Hersteller
4 µl	qScript cDNA Supermix	Quantabio
1 µg	RNA	
x µl (auf 20 µl)	Nuclease-freies Wasser	Promega

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler zu folgenden Bedingungen inkubiert (Tab. 6).

Tabelle 6: Konditionen für cDNA-Synthese im Thermocycler

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	5 Minuten	25 °C
1	30 Minuten	42 °C
1	5 Minuten	85 °C
1	Hold	42 °C

3.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen. Hierzu werden spezifische Primer für die gewünschte Gensequenz und cDNA benötigt. Primer sind Sequenzen, die sich komplementär an die cDNA anlagern und damit den Start für Replikationsenzyme bilden. Es werden Primer für Anfang und Ende der gewünschten Sequenz benötigt. In mehreren Zyklen aus verschiedenen Temperaturschritten wird die Doppelstrang-DNA zunächst denaturiert. Dann folgt der Anlagerungs-Schritt (*annealing*), in welchem sich die Primer der komplementären Sequenz anlagern. Als letztes erfolgt die Elongation, also Vervielfältigung der Sequenz durch die Taq-Polymerase, einer bakteriellen thermostabileren Polymerase. Hierzu werden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt.

Es wurde folgender Ansatz pipettiert (Tab. 7).

Tabelle 7: Pipettierschema „PCR“

Menge	Komponente	Hersteller
5 µl	GoTaq Puffer (5x)	Promega
0,5 µl	dNTP Mix (10mM)	ThermoFischer Scientific
0,25 µl	sense-Primer	
0,25 µl	antisense-Primer	
0,2 µl	GoTaq-Polymerase (5U/µl)	Promega
2 µl	cDNA	
16,8 µl	Nukleasefreies Wasser	Promega

Als Standard wurde folgendes Programm gewählt (Tab. 8).

Tabelle 8: PCR-Programm „Standard“

Zyklen	Zeit	Temperatur
	<i>Lid</i>	105 °C
	<i>Hold</i>	95 °C
1	5 Minuten	95 °C
	30 Sekunden	95 °C
35	30 Sekunden	60 °C
	45 Sekunden	72 °C
	<i>Hold</i>	12 °C

Für die Vektorsynthese wurde ein weiteres Programm etabliert: Primer mit zusätzlicher Schnittstelle für Restriktionsenzyme benötigen zusätzliche Vorzyklen mit niedrigerer *annealing*-Temperatur. Durch die zusätzliche Restriktionsstelle stimmt die Sequenz der Primer nicht zu 100% mit der cDNA überein, beziehungsweise die Restriktionsstelle ist der eigentlichen Primersequenz angeschlossen. Mit Hilfe einer niedrigeren *annealing*-Temperatur in den Vorzyklen können sich auch kürzere Primer an die cDNA anlagern und so den Start für die Replikation bilden. Auf diese Weise entsteht als Produkt die Gensequenz als Doppelstrang-DNA mit einer zusätzlichen Schnittstelle für ein

Restriktionsenzym, welche für Klonierungsschritte genutzt werden kann. Speziell betrifft dies die Primer "H2AFB_rev_BamHI" und "H2AFB_for_EcoRI". Für eine Polymerasekettenreaktion mit diesen Primern wurde folgendes Programm gewählt (Tab. 9.).

Tabelle 9: PCR-Programm „Primer mit Schnittstelle“

Zyklen	Zeit	Temperatur
	<i>Lid</i>	105°C
	<i>Hold</i>	95°C
1	5 Minuten	96°C
	30 Sekunden	95°C
5	30 Sekunden	35°C
	45 Sekunden	72°C
	30 Sekunden	95°C
31	30 Sekunden	60°C
	45 Sekunden	72°C
1	5 Minuten	72°C
	<i>Hold</i>	12°C

3.2.5 PCR-Produkt-Aufreinigung

Um das PCR-Produkt für weitere Verfahren, wie zum Beispiel die Vektorsynthese, nutzen zu können, muss dieses von anderen Stoffen, wie Enzymen und cDNA, getrennt werden. Hierzu wurde das PCR- und Gel-Clean up Nucleo Spin® von Mackery-Nagel nach Protokoll des Herstellers genutzt. Das entstandene Eluat wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese können Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt werden. Dies erfolgt durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten im elektrischen Feld, abhängig vom Molekulargewicht der Nukleinsäuren.

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1,5%iges Argarosegel hergestellt. Hierfür wurden 80 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) mit 1,2 g Universalargarose vermischt und 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Durch die Erhitzung verdunstetes Wasser und 6 µl Ethidiumbromid zum Färben der Nukleinsäuren wurden hinzugegeben. Nach dem Gießen wurde das Gel etwa 20 min zum Auskühlen stehen gelassen. Ethidiumbromid ist ein Interkalator. Es lagert sich in Nukleinsäuren ein und macht sie auf diese Weise unter UV-Licht sichtbar. Nach vollständiger Aushärtung wurde der Gelkamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden vorsichtig in die entstandenen Taschen gefüllt. Proben, welche nicht aus der PCR stammten (hier ist bereits ein Farbstoff enthalten), mussten zudem zuvor mit entsprechender Menge Ladepuffer gefärbt werden. Um die Größe der Proben

abschätzen zu können, wurden zusätzlich DNA-Leitern aufgetragen. Hierfür wurde folgender Ansatz pipettiert (Tab. 10).

Tabelle 10: Pipettierschema „DNA-Leiter“

Menge	Komponente	Hersteller
10 µl	Wasser	B. Braun
1,5 µl	Leiter (100bp Plus oder 1kbp)	Invitrogen
3 µl	6x DNA Loading	ThermoFischer Scientific

Initial wurde die Spannung der Elektrophoresekammer bei 80 Volt gewählt. Nach etwa 10 Minuten wurde die Spannung auf 100 Volt erhöht. Die Visualisierung erfolgte im Imager Quantum ST5 unter UV-Licht.

3.2.7 Isolierung von DNA aus Argarosegel

Um einzelne Banden aus der Gelelektrophorese zu isolieren, wurden diese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel heraus geschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet möglichst die komplette Bande und wenig Gel zu entnehmen. Anschließend wurden die Gelstücke auf einer Feinwaage gewogen und die Nukleinsäure mittels GeneJet Gel Extraktion Kit von Thermo Scientific nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Das Eluat wurde anschließend spektrophotometrisch gemessen und bei -20 °C gelagert.

3.2.8 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Zur Untersuchung der Basenabfolge von Nukleinsäuresequenzen erfolgte eine Sequenzierung.

Hierfür wurde zunächst eine PCR der Nukleinsäure-Proben durchgeführt. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert und vorsichtig vermischt (Tab. 11).

Tabelle 11: Pipettierschema „Sequenzierung“

Menge	Komponente	Hersteller
0,2 µl	Primer (sense oder antisense)	
2 µl	Big-Dye-Puffer	Applied Biosystem TM
1 µl	Big-Dye-Mix	Applied Biosystem TM
300 ng / 10-30 ng	Vektor / Nukleinsäure	
auf 10 µl	HPLC-Wasser	Invitrogen

Die Konditionen der PCR wurden wie folgt gewählt (Tab 12).

Tabelle 12: PCR-Programm „Sequenzierung“

Zyklen	Zeit	Temperatur
30	10 Sekunden	95 °C
	4 Minuten	60 °C
	<i>Hold</i>	12 °C

Danach folgte die Fällung des PCR-Produktes. Hierfür wurden 1 µl 3 M NaOAc, pH 4,6 und 25 µl 100% EtOH hinzugegeben. Die Probe wurde gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurde sie für 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, 25 µl 70% EtOH zugegeben und die Probe für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut abgenommen wurde, wurde die Probe in der SpeedVac getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte im HLA-Labor des Universitätsklinikums Halle. Die Sequenzen wurden mit Gensequenzen aus der NCBI-Datenbank verglichen.

3.2.9 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Quantitative *real-time* PCR dient der quantitativen Analyse von Nukleinsäuren. Sie besteht aus mehreren aufeinander folgenden Zyklen. Jeder Zyklus besteht entsprechend der PCR aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Die Menge des amplifizierten DNA-Fragments wird nach jedem Zyklus analysiert. Dies ermöglicht der zugegebene Farbstoff (*SYBRgreen*), welcher fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. So kann die Menge anhand der zunehmenden Fluoreszenz quantifiziert werden.

Als Referenzgen wurde das *housekeeping gene* HPRT1 bei jeder Messung mitbestimmt.

Um Verunreinigungen der verwendeten Substanzen auszuschließen, wurde pro Primeransatz eine Negativkontrolle mit Wasser statt cDNA gemessen. Bei der Messung von Proben aus Vektor-transfizierten Zellen wurde zudem RNA der jeweiligen Probe statt der cDNA mitgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch genomische DNA auszuschließen.

Der Ansatz wurde auf Eis, unter der Sterilbank und mit RNA-Spitzen pipettiert und nach folgendem qRT-PCR-Programm inkubiert (Tab. 13,14).

Tabelle 13: Pipettierschema „qRT-PCR“

Menge	Komponente	Hersteller
10 µl	GoTaq® qPCR Master Mix	Promega
7 µl	Nuklease-freies Wasser	Promega
1 µl	sense Primer	
1 µl	antisense Primer	
1 µl	cDNA	

Tabelle 14: qRT-PCR-Programm

Zyklen	Zeit	Temperatur
39	30 Sekunden	95 °C
	30 Sekunden	60 °C
	45 Sekunden	72 °C

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Zunächst wurde ein *threshold* bei 0,2 gewählt. Der *threshold-cycle*-Wert (CT-Wert) beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die Kurve des untersuchten Gens in einer Probe diesen *threshold* und somit eine definierte Fluoreszenz erreicht hat. Dem CT-Wert des untersuchten Gens wurde der entsprechende CT-Wert des Kontrollgens HPRT1 der Probe abgezogen. Auf diese Weise entsteht der *delta*-CT-Wert. Als nächstes wurde eine Probe festgelegt, welche den Nullwert darstellt (zum Beispiel die Leervektor-Probe bei transfizierten Zellen). Der Wert dieser Probe wurde von den übrigen Proben abgezogen. So entsteht der *delta-delta*-CT-Wert. Mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ erhält man den *fold change*-Wert der jeweiligen Probe. Anhand dieses Wertes kann die Genexpression der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden.

Die Negativkontrolle mit Wasser sollte möglichst keinen oder einen Anstieg in einem sehr späten Zyklus haben. Ist ein Anstieg in einem frühen Zyklus zu beobachten, muss von einer Verunreinigung der verwendeten Substanzen ausgegangen werden. Außerdem sollte die Kurve der untersuchten Gene ungefähr gleich aussehen und nur in der Höhe des *Peaks* variieren, je nachdem wie viel Produkt vorhanden ist. Bei der RNA-Kontrolle der transgenen Zellen sollte ebenso ein möglichst geringer Wert entstehen, da ansonsten nicht sicher auszuschließen ist, dass die Vektor-DNA die vermeidliche Überexpression der zugehörigen cDNA-Probe ausmacht. Für guten Erfolg der qRT-PCR ist es zudem sinnvoll Primerpaare zu verwenden, welche nur ein relativ kleines Produkt ergeben. Hierfür wurden entsprechende qRT-PCR-Primer verwendet.

3.2.10 *Microarray*-Analyse

Für die *Microarray*-Analyse wurde die RNA wie oben beschrieben gewonnen und aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit der Probe wurde spektrophotometrisch bestimmt. Nach der cDNA-Synthese aus einem Teil der RNA wurde in einer qRT-PCR die Expression von H2AFB untersucht. Es wurden die *Microarrays* ‚Human Transcriptome 2.0‘ von Affymetrix und etwa 100 ng RNA verwendet. Die Aufbereitung der Arrays erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle. Die Rohdaten wurden freundlicherweise von Martin S. Staeger mit der Software Affymetrix *Expression Console* in eine Texttabelle umgewandelt.

3.3 Klonierungsmethoden

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment, das Insert, in einen linearisierten Vektor ligiert. Auf diese Weise entsteht ein Plasmid mit dem DNA-Fragment, welches in Bakterien transformiert und in diesen vervielfältigt werden kann.

3.3.1 Vektorsynthese

Um die cDNA für H2AFB in Zellen *in vitro* zu überexprimieren wurden Plasmid-Vektoren erstellt. Plasmide sind Ringe aus doppelsträngiger DNA, welche aus verschiedenen funktionellen Regionen bestehen. So besitzen sie eine Region, die *multiple cloning site* genannt wird. Hier befinden sich Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, welche es ermöglichen DNA-Fragmente zu übertragen. Die *Insert Site*, also der Ort, an dem das DNA-Fragment eingebracht wird, liegt zwischen Restriktionsenzym-schnittstellen. In der Nähe dieser Region befindet sich bei Vektoren, die zur Expression in eukaryotischen Zellen erstellt werden, ein Promoter, welcher zum Ablesen des eingebrachten DNA-Fragmentes dient. Des Weiteren findet man oftmals eine Sequenz für ein fluoreszierendes Markerprotein wie GFP. Diese Marker dienen zur optischen und photometrischen Selektion transgener Zellen im FACS. Es gibt sogenannte Fusionsprotein-Vektoren, die so gebaut sind, dass dieses Markerprotein direkt an das überexprimierte Protein angebaut wird. Hierdurch kann die genaue Lokalisation des Proteins in der Zelle untersucht werden. Außerdem besitzen Plasmide für den Einsatz in der Gentechnik eine Region für eine Antibiotika-Resistenz. Dies ermöglicht es Bakterien, die den Vektor nach der Transformation aufgenommen haben, zu selektionieren. Vektoren, die zur Expression in eukaryotischen Zellen genutzt werden, besitzen zudem eine Region mit einer Resistenz für Selektionssubstanzen, wie zum Beispiel G418 oder Blastizidin. Diese Substanzen sind toxisch für eukaryotische Zellen. Die Regionen dienen daher der Selektion transgener Zellen. Die Vektor-DNA wird nach der Transfektion entweder in die DNA der Zelle eingebaut oder

verbleibt episomal in der Zelle und wird so abgelesen.

Zur Synthese von pGEM-T EasyxH2AFB wurde die cDNA für H2AFB aus der RNA der Zelllinie L428 mittels Polymerasekettenreaktion gewonnen, aufgereinigt und in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy eingebracht. Für die Polymerasekettenreaktion wurden verschiedene Primerkombinationen genutzt.

pGEM-T Easy kann durch seinen Aufbau DNA-Fragmente ohne vorherigen Restriktionsschritt aufnehmen. Hierfür liegt er bereits in linearisierter Form vor und besitzt an beiden Enden der *Insert-Site* 3'-Thymidin-Überhänge. Diese 3'-T-Überhänge verhindern die Rezirkulation des Vektors und stellen kompatible Überhänge für PCR-Produkte von thermostabilen Polymerasen da. Diese fügen in der Polymerasekettenreaktion einzelne Desoxyadenosine an die 3'-Enden der PCR-Produkten an (Promega, 2015). pGEM-T Easy kann lediglich zur Vervielfältigung einer DNA-Sequenz in Bakterien genutzt werden.

Auf beiden Seiten des Inserts in pGEM-T Easy befindet sich die *multiple cloning site* mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme. Dadurch entstehen auf beiden Seiten des DNA-Fragments Schnittstellen, die für das Einbringen in den Expressionsvektor genutzt werden können. pGEM-T Easy besitzt zur Selektion in Bakterienzellen eine Sequenz zur Ampicillin-Resistenz.

Als erster Schritt bei der Erstellung rekombinanter Vektoren steht die Ligation eines zuvor durch Restriktionsenzyme geöffneten oder im Fall von pGEM-T Easy bereits geöffnet vorliegendem Leervektors und eines Inserts.

Für die Synthese der transgenen pGEM-T Easy-Vektoren wurde ein Ligationsansatz in ein 0,5 ml-Tube mit geringer DNA-Bindungskapazität pipettiert (Tab. 15).

Tabelle 15: Pipettierschema „Ligation pGEM-T Easy“

Menge	Komponente	Hersteller
5 µl	Rapid Ligation Buffer (2x) T4 DNA Ligase	Promega
1 µl	pGEM-T Easy Vektor	Promega
X µl*	PCR-Produkt (Insert)	
1 µl	T4 DNA Ligase	Promega
auf 10 µl	Nuclease-freies Wasser	Promega

* Formel: $\frac{10 \times 50\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}}$

bp Vektor

Die Lösung wurde durch Pipettieren vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anlagerung des Inserts an den geöffneten Leervektor erfolgte automatisch. Die Enden wurden mit dem Enzym Ligase verbunden und es entstand ein Vektor-Ring.

Es folgte die Transformation der Vektoren. Als Transformation bezeichnet man die Übertragung eines Vektors in eine Bakterienzelle. Der Schritt dient der Vervielfältigung des Vektors. Als Bakterien wurden kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue (*E. Coli*) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) verwendet.

Zunächst wurden 100 µl kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und in ein 15 ml-Rundboden-Tube überführt. 10 µl des Ligationsansatzes wurden hinzugegeben und vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit sollen sich die Vektoren an die Zellwand der Bakterienzellen anlagern. Danach folgt der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad, bei dem die Zellwand der Bakterienzelle kurzfristig durchlässig gemacht werden soll und die bereits angelagerten Vektoren in die Zelle eindringen können. Der Ansatz wurde dann für 2 Minuten auf Eis inkubiert, 1 ml vorgewärmtes Nährmedium (SOB) wurde hinzugegeben und die Lösung wurde für 60 Minuten bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Bakterien sollen sich in dieser Zeit von der Behandlung erholen und mit dem Stoffwechsel beginnen.

Nach etwa einer Stunde Kultivierung im Schüttler wurden die Bakterien in ein 0,5 ml-Tube gegeben und auf niedrigster Stufe für etwa 5 Minuten zentrifugiert. Durch Dekantieren wurde überflüssiges Medium verworfen. Das Bakterien-Pellet wurde mit dem restlichen Medium durch vorsichtiges Pipettieren vermischt, auf eine vorgewärmte Agarplatte gegeben und mit einem Spatel verteilt. Den Agarplatten wurde, entsprechend jeweiliger Resistenz der Vektoren, Antibiotika zugegeben. pGEM-T Easy besitzt eine Sequenz für die Resistenz gegen Ampicillin. Auf diese Weise können sich nur die Bakterien vermehren, welche den Vektor zuvor aufgenommen haben.

Die Platten wurden über Nacht (<16 Stunden) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach etwa 12-16 Stunden waren auf den Platten Bakterienkolonien gewachsen. Einzelne davon wurden mit einer Pipettenspitze entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Nährmedium (LZB) und entsprechendem Antibiotikum in einer Konzentration von 50 mg/ml überführt. Das Röhrchen wurde wiederum über Nacht (<16 Stunden) in einen Schüttler bei 37 °C und 150 rpm gestellt.

Nach weiteren 12-16 Stunden Inkubation hatten sich die Bakterien stark vermehrt und

es konnten größere Mengen des Vektors aus ihnen isoliert werden. Hierfür wurden 8 von 10 ml Bakterienlösung in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurden die Vektoren mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit von ThermoFischer Scientific präpariert.

Die Konzentration des Eluats wurde spektrophotometrisch bestimmt und es wurde bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde ein Probeverdau mit einem Restriktionsenzym durchgeführt, welches an beiden Enden des Inserts schneidet. In der darauf folgenden Gelelektrophorese entsteht so ein linearisierter Vektor und ein kleineres Fragment, das ungefähr der Größe des Inserts entspricht. Zum Vergleich wurde ein ungeschnittener Vektor auf das Gel aufgetragen, welcher sich in verschiedenen großen Banden und nicht in der linearisierten Form darstellt.

Der Vektor pGEM-T Easy kann nicht zur Expression eines Proteins in der Zellkultur verwendet werden. Deswegen wurden verschiedene Expressionsvektoren erstellt, die zur Expression in eukaryotischen Zellen genutzt werden können. Es wurden die gekauften Leervektoren pIRES2-AcGFP und pAcGFP1-N3 verwendet. Aus pAcGFP1-N3 kann ein Fusionsprotein mit GFP generiert werden, welches es ermöglicht die genaue Lokalisation des eingebrachten Proteins in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Aus pIRES2-AcGFP entstehen im Gegensatz dazu zwei einzelne Proteine: das eingebrachte Protein und AcGFP. Es wurden zwei verschiedene Varianten des Vektors pIRES2-AcGFPxH2AFB und drei des Vektors pAcGFP1-N3xH2AFB generiert. Da die Fluoreszenz von pIRES2-AcGFPxH2AFB, vermutlich aufgrund der Produktgröße von H2AFB, nicht ausreichend war, wurde in den Zellexperimenten bevorzugt mit pAcGFP1-N3xH2AFB gearbeitet.

Die gekauften Leervektoren wurden zunächst vervielfältigt. Hierzu wurden ca. 0,5 µl der gekauften Leervektoren in kompetente E. Coli Bakterien transformiert und die Plasmide präpariert.

Die Expressionsvektoren lagen, anders als pGEM-T Easy, in Plasmid-Form vor und mussten zunächst durch einen Restriktionsschritt linearisiert werden. Die Restriktion erfolgte durch Enzyme, die die dsDNA an spezifischen Sequenzen aufschneiden. Entsprechend wurde auch das DNA-Fragment zum Einbringen in den Vektor bearbeitet. Für einen Ansatz von 20 µl folgendes pipettiert (Tab. 16).

Tabelle 16: Pipettierschema „Restriktionsverdau“

Menge	Komponente
1-2 µg	DNA
2 µl	Puffer (10x)
10 U	Enzym
auf 20 µl	Nuclease-freies Wasser

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden Enzyme bei entsprechender Temperatur inaktiviert.

Es folgte die Synthese der Expressionsvektoren. Für pIRES2-AcGFPxH2AFB wurde das Insert aus der Primerkombination „H2AFB1-3_left_klon + H2AFB13_right“ aus pGEM-T EasyxH2AFB mit dem Restriktionsenzym EcoRI von ThermoFischer Scientific und entsprechendem EcoRI *buffer* herausgeschnitten. Der Leervektor pIRES2-AcGFP wurde auf gleiche Weise mit EcoRI geschnitten. Der Ansatz wurde bei 37 °C im Thermocycler für eine Stunde inkubiert. Auf diese Weise sind an Vektor und Insert Enden entstanden, die sich miteinander verbinden können. Um die Enzyme zu inaktivieren wurden die Lösungen für 20 Minuten bei 65 °C im Thermocycler inkubiert.

Damit sich der geöffnete Vektor nicht wieder verschließt, folgte ein Dephosphorylierungsschritt mit folgendem Ansatz (Tab 17).

Tabelle 17: Pipettierschema „Dephosphorylierung“

Menge	Komponente	Hersteller
1 µg	DNA	
1 µl	FastAP	ThermoFischer Scientific
2 µl	FasrAP-Puffer	ThermoFischer Scientific

Der Ansatz wurde vermischt, abzentrifugiert und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer Gelelektrophorese in ihre Einzelfragmente aufgetrennt. Es wurden gewünschte Fragmente, also linearisierter Leervektor und Insert aus pGEM-T EasyxH2AFB, aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem GeneJet Gel Extraktion Kit von ThermoFischer Scientific isoliert.

Mit diesen Fragmenten konnte dann die Ligation des Expressionsvektors pIRES2xH2AFB erfolgen. Für 10 µl Ligationsansatz wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert (Tab. 18).

Tabelle 18: Pipettierschema „Ligation Expressionsvektoren“

Menge	Komponente	Hersteller
50 ng	Vektor	
42 ng	Insert	
1 µl	T4 Ligase-Puffer	ThermoFischer Scientific
2,5 U	T4 Ligase	ThermoFischer Scientific

Der Ansatz wurde vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Wie im oben genannten Protokoll erfolgte die Transformation in kompetente E. Coli Bakterien. pIRES2-AcGFP besitzt eine Sequenz für die Resistenz für Kanamycin. Entsprechende Agarplatten und Antibiotika im Nährmedium (LZB) wurden verwendet. Durch einen Probeverlauf wurde der Erfolg des Verfahrens und die Ausrichtung des Inserts im Vektor in der Gelelektrophorese überprüft. Da das Insert auf beiden Seiten mit dem gleichen Enzym aus dem Vektor pGEM-T EasyxH2AFB herausgeschnitten wurde, konnte es sowohl vorwärts als auch rückwärts in PIRES2-AcGFP eingebaut werden. Zudem war die Ausrichtung in pGEM-T EasyxH2AFB nicht bekannt. Da der Promotor für das Ablesen der Sequenz jedoch nur auf einer Seite der *insert-site* liegt, kann nur eine Ausrichtung für die erfolgreiche Expression verwendet werden. Um Vektoren mit der richtigen Ausrichtung zu identifizieren, wurden sie mit einem Enzym geschnitten, das einmal außerhalb und einmal innerhalb des Inserts scheidet. Je nachdem welche Ausrichtung des Inserts im Vektor vorlag sollte somit ein größeres oder kleineres Fragment entstehen.

Auf diese Weise konnten 2 Vektoren pIRES2xH2AFB erstellt werden. Diese wurden wie oben beschrieben, sequenziert, um Mutationen durch Bakterien und PCR auszuschließen.

Um den Expressionsvektor pAcGFP1-N3xH2AFB zu erstellen, wurden die Inserts der Primerkombinationen „H2AFB_for_EcoRI + H2AFB_rev_BamHI“, „H2AFB 1-3 left_klon + H2AFB_rev_BamHI“ und „H2AFB_left_klon + H2AFB_rev_BamHI“ aus dem entsprechenden pGEM-T Easy+H2AFB verwendet. Durch die verschiedenen Anfangsprimer sollten verschiedene Varianten von H2AFB entstehen.

Aus dem pGEM-T EasyxH2AFB-Vektor wurden die verschiedenen Inserts a) mit EcoRI und (2x) BamHI und 2x Tango *buffer* von ThermoFischer Scientific und b) mit (2x) SacI und BamHI und BamHI *buffer* von ThermoFischer Scientific herausgeschnitten. Auf diese Weise konnten sowohl die vorwärts als auch die rückwärts ausgerichteten Inserts aus pGEM-T EasyxH2AFB ausgeschnitten werden. Entsprechend wurde auch der Leervektor pAcGFP1-N3 behandelt. Nach Empfehlung des Herstellers wurden Inkubationsbedingungen, eine Stunde bei 37 °C und Inaktivierungsbedingungen, 20

Minuten bei 80 °C, gewählt.

Anschließend erfolgte wieder die Dephosphorylierung des Leervektors pACGFP1-N3. Entsprechend des oben genannten Protokolls erfolgte die Aufreinigung mit Gelelektrophorese und Gelelution, Ligation, Transformation und Isolation aus den Bakterien. Auch der Vektor pAcGFP1-N3 besitzt eine Sequenz für eine Kanamycin-Resistenz. Nach einem Probeverlauf wurde je ein Vektor pro Primerkombination ausgewählt und sequenziert. Die Vektoren wurden bis zur Transfektion bei -20 °C gelagert.

Für ausreichende Mengen der erstellten Vektoren für die Experimente wurde eine Midiprep durchgeführt. Hierfür wurden Bakterien in 100 ml Nährmedium (LZB) und entsprechender Menge Antibiotika 12-16 Stunden bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Dann erfolgte die Präparation von je 50 ml Bakterienlösung nach Protokoll mit dem Kit GeneJET Plasmid Midiprep von ThermoFischer Scientific.

Die Konzentrationen wurden spektrophotometrisch bestimmt und das Eluat gegebenenfalls in der SpeedVac aufkonzentriert.

Zur langfristigen Sicherung der Bakterien mit Expressionsvektor wurden Glycerolstöcke erstellt. Aus diesen können kleinste Mengen entnommen werden und nach Auftauen wieder in Kultur genommen werden, um den Vektor zu isolieren.

Hierzu wurden 1 ml Bakterienlösung mit 200 µl Glycerin in ein Kryo-Röhrchen gegeben. Die Mischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der ‚Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und der American Type Culture Collection (ATCC).

Zelllinien:

A673: humanes Ewing-Sarkom: Die adhärenenten Zellen wurden 1973 aus dem Tumor einer 15-jährigen Patientin isoliert. (Martínez-Ramírez *et al.*, 2003; Coleman und Roberts, 2004; Teicher *et al.*, 2011).

L428 (DSMZ-Nummer: ACC-197): Die Zellen wurden 1978 aus dem Pleuraerguss einer 37-jährigen Patientin mit Hodgkin-Lymphom (nodulär, sklerosierend, refraktär, Stadium IVB) isoliert. Die Suspensionszellen wachsen einzeln oder in Trauben, bilden Stacheln aus und können polymorph sein. 1-5 % der Zellen machen mehrkernige Riesenzellen aus (Schaadt *et al.*, 1979; Drexler, 1993).

Für die Untersuchungen wurde zusätzlich RNA von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Spendern (Ethikvotum: Bearbeitungsnummer 2016-111), sowie RNA von verschiedenen Tumorzellen und Geweben verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe bereit gestellt wurde. Im einzelnen war dies RNA aus den Ewing-Sarkom-Zelllinien SK-N-MC, RDES, den Neuroblastom-Zelllinien SIMA, KELLY, IMR5, den ALL-Zelllinien NALM6 (B-ALL), Jurkat (T-ALL), der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi und Gewebe von gesundem Hoden.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten aseptisch unter einer sterilen Werkbank. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde DMEM für A673- und RPMI für L428-Zellen verwendet. Dem Medium wurde jeweils 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fetales Kälberserum zugesetzt. Die Zelllinien wurden alle 3-4 Tage gesplittet und mit frischem Medium versorgt. A673-Zellen wurden meist im Verhältnis 1:10 gesplittet. L428-Zellen wurden 1:2 bis 3:10 gesplittet. Für die Lösung adhärenter Zellen von dem Kulturflaschenboden wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und Reste davon mit DPBS abgewaschen. Dann wurde Trypsin-EDTA so hinzugegeben, dass der Flaschenboden vollständig bedeckt war. Die Zellen wurden 2-4 Minuten mit der Substanz im Brutschrank inkubiert. Um die Ablöse-Reaktion durch Trypsin-EDTA zu stoppen, wurde frisches Medium hinzugefügt und das Zell-Medium-Gemisch durch vorsichtiges Pipettieren homogenisiert. Entsprechend des Splittverhältnisses wurde ein Teil der Lösung in eine neue Flasche gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt.

3.4.1 Einfrieren und Auftauen

Um Zellbestände zu konservieren besteht die Möglichkeit diese einzufrieren. Hierfür wurden die Zellen geerntet und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. A673-Zellen wurden zuvor entsprechend mit Trypsin-EDTA gelöst. Um die Zellen vom Medium zu trennen wurden sie bei 210 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurden etwa 5x10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium (entsprechendes Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen isopropanolhaltigem Gefriercontainer (M. Frosty) im -80 °C Gefrierschrank langsam heruntergekühlt. Da DMSO toxisch für Zellen ist, sollten die Schritte relativ zügig ablaufen. Für eine langfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen nach etwa 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut und der Inhalt mit ca. 10 ml Zellkulturmedium in Zentrifugengefäß überführt. Anschließend wurden sie bei 210 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflasche überführt.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden hierzu geerntet und mit Trypanblau (1:10) gefärbt. Anschließend wurde die Zellsuspension in die bereits vorbereitete Zählkammer pipettiert. Trypanblau dringt nur in Zellen mit geschädigter Membran ein. Auf diese Weise kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Die ungefärbten Zellen wurden dann in den vier Großquadranten ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl pro ml}$$

3.4.3 Transfektion

Das Ziel einer Transfektion ist es, fremde DNA in Zellen einzubringen. Dafür muss die Zellmembran für kurze Zeit durchgängig sein. Es gibt verschiedene Verfahren dies zu erreichen. So können bestimmte Reagenzien die Zellmembran kurzzeitig durchgängig für Nukleinsäuren machen. Ein anderes Verfahren stellt die Elektroporation dar, bei der ein Stromimpuls kurzzeitig auf die Zelle einwirkt. Die Verfahren eignen sich für verschiedene Zellarten unterschiedlich gut. So wurde für die adhärenenten Zellen das Transfektionskit PromoFectin Transfection Reagent von PromoKine und für die Suspensionszellen Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit L von Lonza verwendet.

Für die Transfektion der adhärenenten Zelllinie A673 wurde PromoFectin verwendet. Die Zellen wurden zunächst geerntet und 200.000-400.000 je Well auf eine 6-Wellplatte ausgesät. Am Folgetag sollten die Zellen etwa 50-60% des Bodens bedecken. Für jedes Well wurden dann 6 µl Promofectin mit 94 µl Optimem-Medium und 3 µg DNA mit Optimem-Medium auf 100 µl verdünnt. Die Verdünnungen wurden gevortext und zentrifugiert. Je 100 µl Promofectin-Verdünnung und 100 µl DNA-Verdünnung wurden zusammengegeben, wiederum gevortext und zentrifugiert und für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Platte abgesaugt und etwa 1 ml Medium je Well aufgefüllt. Die Promofectin/DNA-Lösung (200 µl je Well) wurde dann schluckweise dem Medium der Platte hinzufügen. Nach einigen Stunden wurden die Platten mit dem restlichen Medium befüllt. Das reduzierte Medium dient dem kürzeren Diffusionsweg der Substanzen.

Nach 24-48 Stunden wurde die Genaktivität in der qRT-PCR mit Primern für das Gen H2AFB „H2AFB_RT_120bp_for“ und „H2AFB_RT_120bp_rev“ und dem Kontrollgen HPRT1 mit „HPRT1_RT_190bp_for“ und „HPRT1_RT_190bp_rev“ überprüft. Außerdem konnte der Erfolg optisch im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

Die Suspensionszellen L428 wurden mittels Elektroporation transfiziert. Einen Tag vor

der Transfektion wurden sie 1:2 gesplittet um ihre Stoffwechselaktivität anzuregen. Für die Transfektion wurde eine 12-Well-Platte mit 1 ml Medium je Well befüllt und im Brutschrank gewärmt. Pro Transfektionsansatz wurden 1.000.000-1.500.000 Zellen geerntet und bei 210 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Für jeden Ansatz wurden 82 µl Cell Line Nucleofector Solution L und 18 µl Supplement vermischt. Das Zellpellet wurde in 100 µl dieser Lösung resuspendiert und es wurden je 2 µg DNA hinzugefügt. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette überführt, in den Küvettenhalter des Elektroporationsgerätes gestellt und das Programm X-01 gewählt. Danach wurden die Zellen für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Küvette inkubiert. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmtes RPMI-Medium hinzugefügt und die Suspension auf die vorbereitete 12-Well-Platte überführt. Nach einigen Stunden wurden auch hier noch etwa 1 ml Medium je Well hinzugefügt.

Die Genexpression wurde wiederum nach 24-48 Stunden in der qRT-PCR und optisch im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

3.5 Zellexperimente

3.5.1 Fluorescence-activated cell scanning (FACS)

Fluorescence-activated cell scanning (FACS) ist ein Analyseverfahren bei dem fluoreszenz-markierte Zellen im Rahmen einer Durchflusszytometrie sortiert und untersucht werden können. Die Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen anhand ihrer Struktur, Größe und Oberflächenrezeptoren unterschieden werden können. Die Zellen werden hierzu einzeln durch eine dünne Messkammer gesaugt und mit einem Laser angestrahlt. Sie erzeugen dabei ein, für jeden Zelltyp charakteristisches, Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bildet ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) dient als Maß für die Zellgranularität. Im FACS können zusätzlich Fluoreszenzen analysiert werden. So können beispielsweise über fluoreszenz-markierte Antikörper Oberflächenrezeptoren untersucht werden oder Zellen durch einen intrazellulären Farbstoff in transgen/nicht-transgen oder tot/lebend unterschieden werden (Fulwyler, 1974; BD, 2002).

Je nach Experiment wurden hierzu die Zellen geerntet, behandelt, in ein FACS-Röhrchen überführt und anschließend in 500 µl DPBS aufgenommen. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden 5 µl Propidiumiodid kurz vor der Messung hinzugegeben.

3.5.2 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse ist ein Verfahren bei dem die DNA von lebenden Zellen gefärbt

und auf diese Weise messbar gemacht wird. Anhand des DNA-Gehaltes einer Zelle können im FACS drei Stadien des Zellzyklus unterschieden werden. Im G0/G1-Stadium liegt ein einfacher DNA-Gehalt vor. In G2/M hat sich der DNA-Gehalt der Zelle bereits verdoppelt. Als S-Stadium wird der Zustand dazwischen definiert. Auf diese Weise kann untersucht werden, wie die Verteilung der Zellen einer Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus ausfällt. So kann es zum Beispiel Hinweise auf Arrest oder beschleunigte Zellteilung geben.

Die Zellen wurden hierfür von der Zellkulturplatte bzw. -flasche geerntet und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. In der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und es wurden pro Ansatz 10^6 Zellen in der Zentrifuge pelletiert. Das überschüssige Medium wurde abgenommen. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde das Pellet in 500 μ l DPBS resuspendiert. Die Suspension wurde in auf Eis gekühlte FACS-Röhrchen mit 4,5 ml 70%igem Ethanol gegeben und für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Mit Hilfe des Ethanols wurden die Zellen im aktuellen Stadium fixiert. Danach wurden die Ansätze bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend die Flüssigkeit durch Dekantieren entfernt. Das Zellpellet wurde erneut in 5 ml DPBS aufgenommen und bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert um restliches Ethanol zu entfernen. Als nächstes wurden die Zellen in 1 ml Färbelösung aufgenommen. Diese bestand aus 0,1% Triton, 10 μ g/ml Propidiumiodid (PI), 100 μ g/ml RNase A und DPBS. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Propidiumiodid interkaliert mit der DNA und macht diese damit sichtbar. Es kann nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran durchgängig ist. Daher wird es auch zur Färbung toter Zellen verwendet. Mit Triton konnte die Zellmembran lebender Zellen perforiert werden und so einen Eintrittsweg für PI geschaffen werden. Anschließend wurden 50.000 Zellen pro Ansatz im FACS gemessen.

Zur Verifizierung der Messgenauigkeit erfolgte die FACS-Auswertung mit zwei verschiedenen Auswertungsverfahren. Bei der Auswertung mit Modfit wurde die Fläche unter den Graphen durch das Computerprogramm errechnet. Bei Cellquest-Pro wurden die Zellzyklus-Phasen manuell festgelegt. Die Gatingstrategie wird beispielhaft im Ergebnisteil gezeigt.

3.5.3 Chemotherapeutika-Resistenz

Die Untersuchung hinsichtlich der Empfindlichkeit auf Chemotherapeutika erfolgte durch die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Chemotherapeutikums Cisplatin. Cisplatin (cis-diaminedichloroplatinum) ist eine in den 1960er Jahren entwickelte Platinverbindung und eines der potentesten Zytostatika (Chen *et al.*, 2009). Seine Hauptwirkung ist die Bindung der DNA. Außerdem löst es über verschiedene

Mechanismen Zellzyklusarrest und Apoptose aus (Eastman, 1990).

Am 1. Tag nach der Transfektion wurden ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well auf eine 24-Well-Platte gesetzt und mit einer absteigenden Konzentration Cisplatin behandelt. Hierfür wurde eine Titrationsreihe mit den Konzentrationen 12,25 µg/ml, 6,125 µg/ml, 3,062 µg/ml und 1,531 µg/ml erstellt. Die Verdünnung erfolgte mit DMF, in welchem Cisplatin auch gelöst wurde. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich in allen Proben die gleiche Menge an DMF befindet. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit der gleichen Menge DMF und eine mit Medium mitgeführt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet und in ein FACS-Röhrchen überführt. Dabei wurde der Überstand der adhärennten Zellen mitgenommen. Die adhärennten Zellen wurden nach Protokoll mit Trypsin/EDTA geerntet. Im FACS-Röhrchen wurden sie bei 210 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das Pellet in 500 µl DPBS aufgenommen. Kurz vor der Messung im FACS wurde jeder Probe 5 µl Propidiumiodid hinzugegeben. Das Propidiumiodid kann nur in Zellen mit nicht-intakter Zellmembran eindringen und markiert somit die apoptotischen Zellen. Anschließend wurden 10000-50000 Zellen im FACS gemessen.

Die Gating-Strategien für die FACScans wurden im Ergebnisteil exemplarisch dargestellt.

3.5.4 Photographische Dokumentation

Für die optische Untersuchung der Transfektionsergebnisse und photographische Dokumentation der Zellen wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert25 mit der AxioCam colour verwendet. Unter UV-Licht konnte die Fluoreszenz der Zellen durch GFP oder Hoechst-Farbstoff untersucht werden. Hoechst-Farbstoff färbt die Zellkerne und Chromosomen lebender Zellen.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle und genregulatorische Besonderheiten der Histonvariante H2AFB in Tumorzellen untersucht werden. Hierzu wurde zunächst, in Form eines Screenings, die basale Expression von H2AFB in verschiedenen Zellen untersucht. Danach wurden Zellen generiert, die H2AFB transgen überexprimieren. Diese wurden hinsichtlich ihres Zellzyklus und der Resistenz auf Cisplatin untersucht. Zur Untersuchung genregulatorischer Funktionen von H2AFB wurde die Co-Expression mit (Humanen) Endogenen Retroviren untersucht. Anschließend wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt und die erhobenen mit Daten aus *Microarray*-Datenbanken verglichen.

4.1 Screening auf die Expression von H2AFB

Initial wurde ein Screening auf die basale Expression von H2AFB in verschiedenen Zellarten erstellt. Die RNA der untersuchten Zelllinien wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, bzw. eigenständig aus bestehenden Zellkulturen gewonnen.

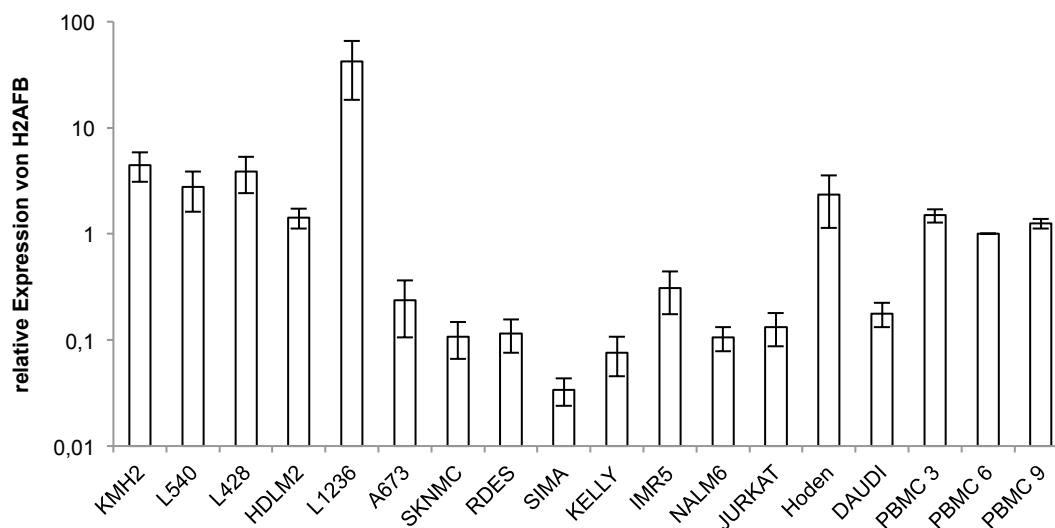


Abbildung 1: Screening auf H2AFB

Dargestellt ist die qRT-PCR mit den Primern für das Gen H2AFB „H2AFB RT120bp for“ und „rev“ und für das Kontrollgen HPRT1 mit „HPRT1 for RT 190bp“ und rev RT 190bp“. Die Daten wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen, 2001). PBMC6 wurde auf 1 gesetzt. Verwendet wurden die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L428, L540, HDLM2, KMH2 und L1236, die Ewing-Sarkom-Zelllinien A673, SKNMC und RDES, die Neuroblastom-Zelllinien SIMA, KELLY und IMR5, die ALL-Zelllinien NALM6 (B-ALL) und Jurkat (T-ALL), Gewebe vom gesunden Hoden, die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi und 3 Proben mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von verschiedenen gesunden Spendern (3,6,9). Die qRT-PCR wurde zur Verifizierung drei mal durchgeführt, wobei die selbe cDNA verwendet wurde. Dargestellt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen.

Wie in der Literatur beschrieben zeigte sich eine erhöhte Expression von H2AFB in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und im Hoden. Die niedrigste Expression von H2AFB unter den getesteten Proben konnte bei der Neuroblastom-Zelllinie SIMA gefunden werden. Unter den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zeigte L1236 die höchste und HDLM2 die niedrigste Expression von H2AFB. Die PBMC-Proben aus Spenderblut zeigten nach Hodgkin-Lymphomzellen und Hoden die höchste Expression (Abb. 1).

4.2 Vektoren

Die Synthese von Expressionsvektoren erfolgte über den Vektor pGEM-T Easy in die Expressionsvektoren pIRES2-AcGFP und pAcGFP1-N3. Hierfür wurde die cDNA für H2AFB zunächst aus der RNA der Zelllinie L428 gewonnen, mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und in den Vektor pGEM-T Easy eingebracht. Für die Polymerasekettenreaktion wurden verschiedene Primerkombinationen genutzt, welche zum Teil zu unterschiedlichen Varianten der cDNA von H2AFB führten.

Für den Expressionsvektor pIRES2-AcGFPxH2AFB wurde die Primerkombination „H2AFB1-3_left_klon + H2AFB13_rev“ genutzt und zwei verschiedene Expressionsvektoren generiert (Abb. 2).

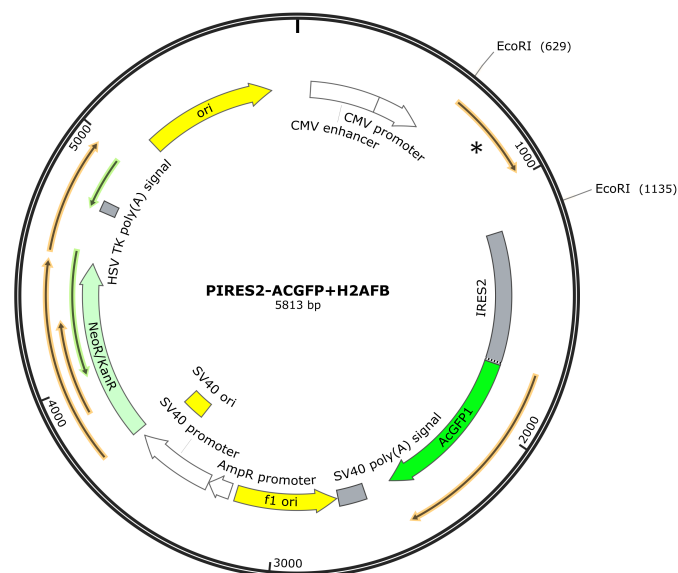


Abbildung 2:
Schematische Darstellung des Expressionsvektors pIRES2-AcGFPxH2AFB
 Dargestellt ist der Expressionsvektor pIRES2-AcGFPxH2AFB. Die Schnittstellen des Enzyms EcoRI für das Einbringen der Gensequenz H2AFB in die *multiple cloning site* sind gekennzeichnet. Der Locus für die Sequenz des Gens H2AFB ist mit * markiert. Zu erkennen sind außerdem die *Ori*-Region als Replikationsstart, die *CMV-Enhancer*- und *-Promotor*-Region, die Region für das Markerprotein AcGFP1, die Neomycin/Kanamycin-Resistenz mit entsprechender *Ori*- und *Promotor*-Region, sowie das HSV TK poly(A) Signal. Das Schema wurde mit der Software SnapGene Viewer erstellt.

PIRES2xH2AFB3.2 besitzt die Nukleinsäuresequenz von H2AFB1 und codiert für das Protein H2AFB1, pIRES2xH2AFB3.3 besitzt die Nukleinsäuresequenz von H2AFB3 und codiert für das Protein H2AFB2/3. Beide Nukleinsäuresequenzen unterscheiden sich nur in einer Base, die Proteine unterscheiden in einer Aminosäure von einander. Da die verwendeten Primer nicht zwischen den Varianten unterscheiden konnten, wurden die enthaltenden Sequenzen durch eine Sequenzierung der Vektoren ermittelt.

Für den Expressionsvektor pAcGFP1-N3xH2AFB wurden die Inserts der Primerkombinationen „H2AFB_for_EcoRIxH2AFB_rev_BamHI“, „H2AFB1-3_left_klon+H2AFB_rev_BamHI“ und „H2AFB_left_klon+H2AFB_rev_BamHI“ verwendet (Abb. 3).

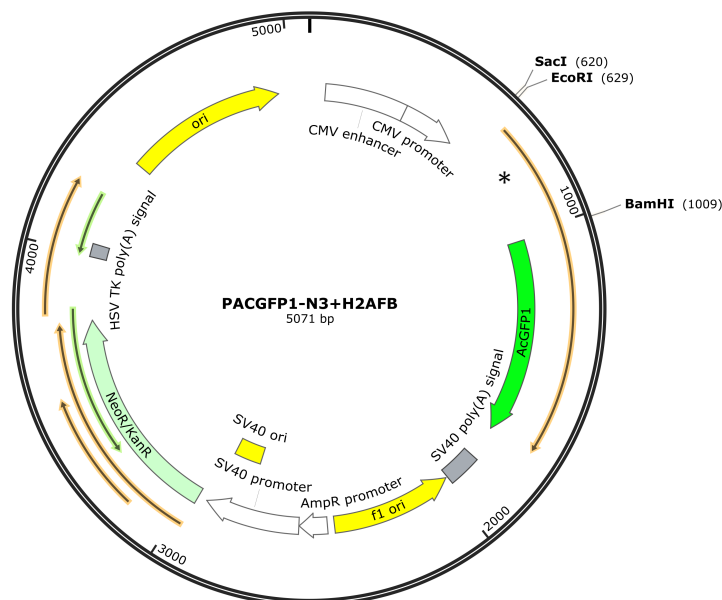


Abbildung 3:
Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAcGFP1-N3xH2AFB
 Dargestellt ist der Expressionsvektor pAcGFP1-N3xH2AFB. Die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme (Kombination 1: EcoRI+BamHI, Kombination 2: SacI+BamHI) sind gekennzeichnet. Der Locus für die Sequenz des Fusionsproteins aus H2AFB und AcGFP1 ist mit * markiert. Zu erkennen sind außerdem die Ori-Region als Replikationsstart, die CMV-Enhancer- und -Promotor-Region, die Neomycin/Kanamycin-Resistenz mit entsprechender Ori- und Promotor-Region, sowie das HSV TK poly(A) Signal. Das Schema wurde mit der Software SnapGene Viewer erstellt.

Durch die verschiedenen Anfangsprimer sollten verschiedene Varianten der cDNA von H2AFB amplifiziert werden. Die Vektoren pAcGFP1-N3xH2AFB113 und pAcGFP1-N3xH2AFB321 besitzen beide die Nukleinsäuresequenz von H2AFB3. Sie wurden mit unterschiedlichen Anfangsprimern generiert. pAcGFP1-N3xH2AFB211 besitzt die Nukleinsäuresequenz des Gens H2AFB2, bei welcher noch ein nicht-codierender Teil

dem Exon vorgeschaltet ist. Auf diese Weise entstehen aus allen drei Vektoren die Proteinvariante von H2AFB2/3.

4.3 Transgene Zellen

Die Transfektion der adhärennten A673-Zellen erfolgte mit dem PromoFectin Transfection Reagent PromoKine von PromoCell. Für die Suspensionszellen L428 wurde das Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit L von Lonza verwendet. Auf diese Weise wurden die zwei Varianten des Vektors pIRES2-AcGFPxH2AFB, der pIRES2-AcGFP-Leervektor, sowie drei Varianten des Vektors pAcGFP1-N3xH2AFB, der Leervektor pAcGFP1-N3 und zum Vergleich der gekaufte Vektor pBOS-H2B-GFP transfiziert.

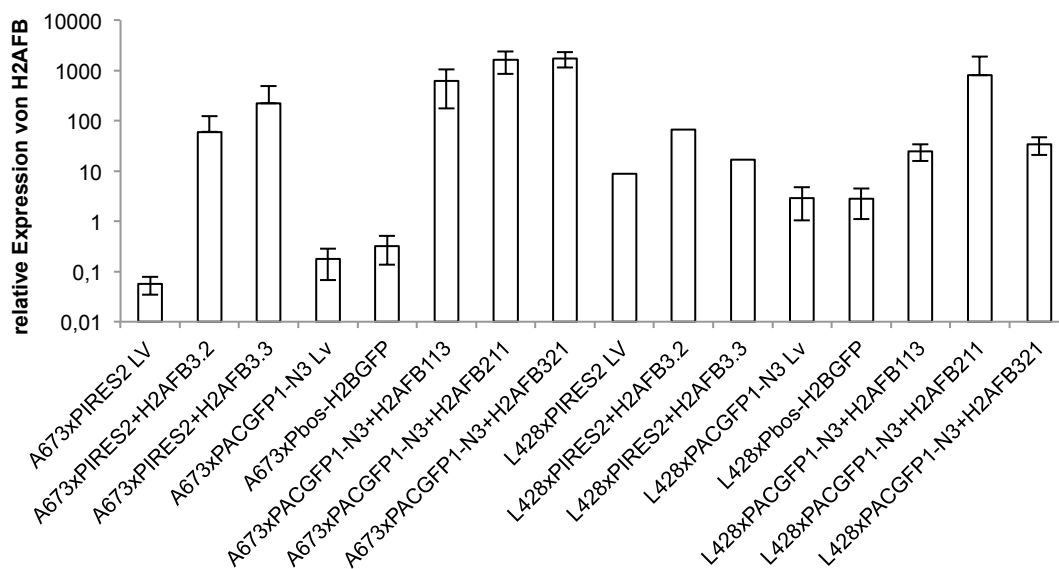


Abbildung 4:

Expression von H2AFB nach Überexpression in A673- und L428-Zellen

Dargestellt ist die Expression von H2AFB in den verschiedenen transgenen Tumorzelllinien A673 und L428. Zur Überexpression von H2AFB wurden die Expressionsvektoren pAcGFP1-N3xH2AGB113, -211 und -321, sowie PIRES2xH2AFB3.2 und -3.3 verwendet. Die Codierung ergab sich hierbei aus den verwendeten Baktereinkulturen während der Vektorsynthese. Unterschiede in verwendeten Vektoren sind im Methoden-Teil erläutert. Wie oben wurde eine qRT-PCR erstellt und der PBMC6-Wert von Abbildung 1 als 1 gesetzt. Bei den Vektoren pAcGFP1-N3 LV/xH2AFB und pBOS-H2B-GFP erfolgte die RNA-Präparation aus mindestens 3 verschiedenen Transfektionen. Bei L428xPIRES2-AcGFP LV/xH2AFB erfolgte die RNA-Präparation aus einer Transfektion. Die Werte für A673xPIRES2-AcGFP LV/xH2AFB stammen wiederum aus 3 Transfektionen. Es wurde jeweils der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung dargestellt.

pBOS-H2B-GFP enthält das Gen für das humane Histon H2B. H2B wird, beim Ablesen des Vektors durch die Zelle, mit einem GFP-Protein fusioniert, sodass ein H2B-GFP-Fusionsprotein entsteht. Dieses wird in die Nukleosomen eingebaut und führt dazu, dass der Zellkern der Zelle grün fluoresziert (Mizushima und Nagata 1990, Kanda et al. 1998, Staeger und Max 2009). pBOS-H2B-GFP stellt somit ein ähnliches Vektor-Modell wie der Expressionsvektor pAcGFP1-N3xH2AFB mit einem kanonischen Histon dar. Die Genexpression wurde 24-48 Stunden nach der Transfektion quantitativ in der qRT-PCR überprüft (Abb. 4).

Um die Expression der Transgene und deren Lokalisation in der Zelle zu überprüfen, wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie erwartet zeigte sich eine Färbung der Zellkerne und Chromosomen in H2B-GFP- und H2AFB-GFP-transgenen Zellen und somit eine Anreicherung der Histon H2B und H2AFB im Zellkern an den Chromosomen. Bei den H2AFB-GFP-transgenen Zellen zeigte sich eine zusätzliche Färbung des Zytoplasmas während der Mitose. Außerdem waren bei diesen Zellen Bereiche höherer Anreicherung im Interphase-Zellkern nach Art von *nuclear speckles* zu sehen. Dieses Phänomen konnte bei H2B-GFP nicht beobachtet werden. Bei den transgenen L428-Zellen konnte außerdem die typische Mehrkernigkeit einiger Zellen in der Kultur dargestellt werden (Abb. 5-13).

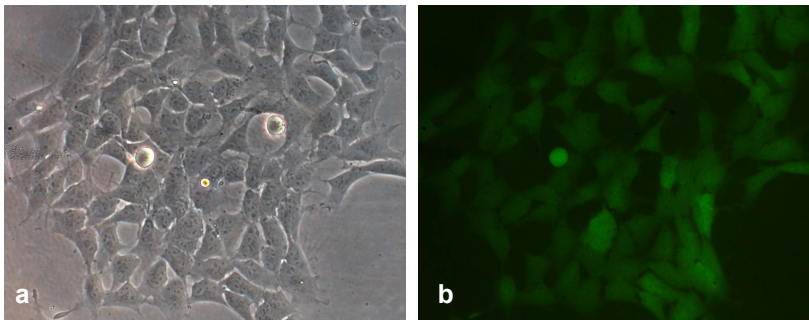


Abbildung 5: pAcGFP1-N3-Leervektor-transgene A673-Zellen nach Selektion
 Dargestellt sind mit dem Leervektor pAcGFP1-N3 transfizierten und bereits mit G418 selektierten A673-Zellen. Aufgenommen mit 20-fach-Objektiv. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Es zeigt sich deutlich die zytoplasmatische Färbung der Zellen mit GFP.

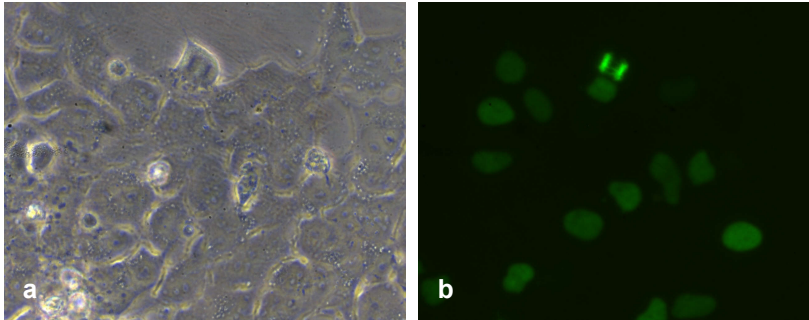


Abbildung 6: H2B-GFP-transgene A673-Zellen: Zellkernfärbung und Chromosomenfärbung in der Anaphase

Gezeigt sind mit dem Vektor pBOS-H2B-GFP-transfizierte A673-Zellen. Die Aufnahme ist zwei Tagen nach der Transfektion entstanden. Aufgenommen mit 40-fach-Objektiv. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Durch die Chromosomenfärbung ist eine Zelle in der Anaphase zu sehen. Des Weiteren zeigt sich eine homogene Anreicherung von H2B-GFP im Kern der Zellen.

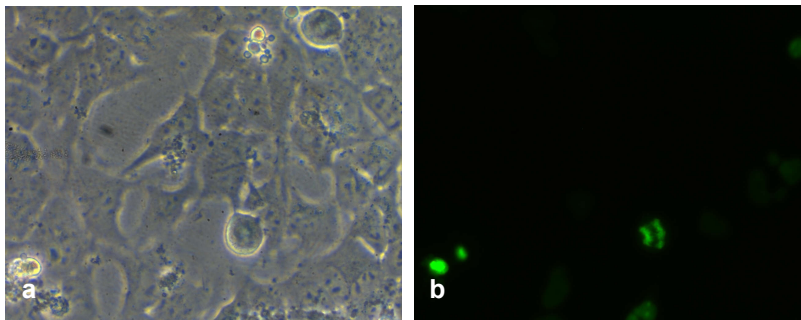


Abbildung 7: H2B-GFP-transgene A673-Zellen: Chromosomenfärbung

Dargestellt sind wieder mit dem Vektor pBOS-H2B-GFP-transfizierte A673-Zellen. Aufgenommen mit 40-fach-Objektiv. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Zu sehen ist eine Anaphase mit dem tumorartigen „Nachhinken“ (*anaphase lagging*) einzelner Chromosomen.

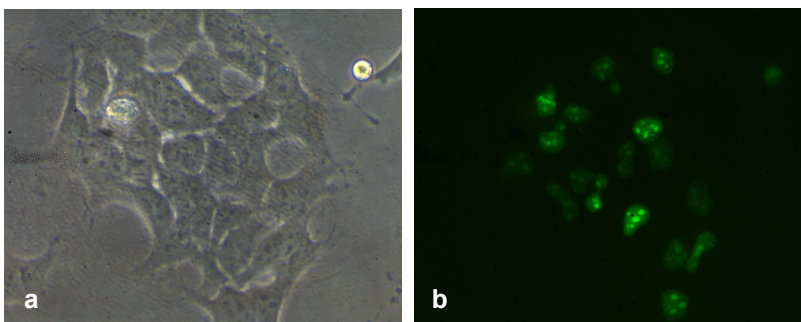


Abbildung 8: H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen nach Selektion

Zu sehen sind mit dem Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB-transfizierte A673-Zellen nach Selektion mit G418. Aufgenommen mit 40-fach-Objektiv. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Es ist eine Kernfärbung und punktuelle Anreicherung im Kern durch H2AFB-GFP zu erkennen.

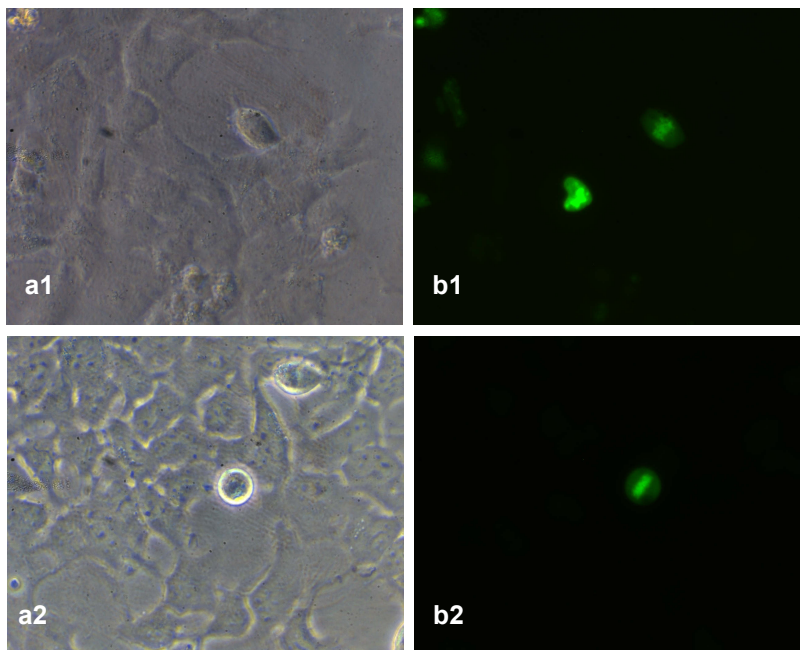


Abbildung 9: H2AFB-GFP transgene A673-Zellen: Mitose

Dargestellt sind wieder mit dem Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB-transfizierten A673-Zellen. Aufgenommen mit 40-fach-Objektiv. **a1,2** Phasenkontrastaufnahme. **b1,2** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Zu sehen ist die Chromosomenfärbung durch H2AFB-GFP während Mitose. Zusätzlich ist während der Mitose das Zytoplasma durch H2AFB-GFP leicht angefärbt.

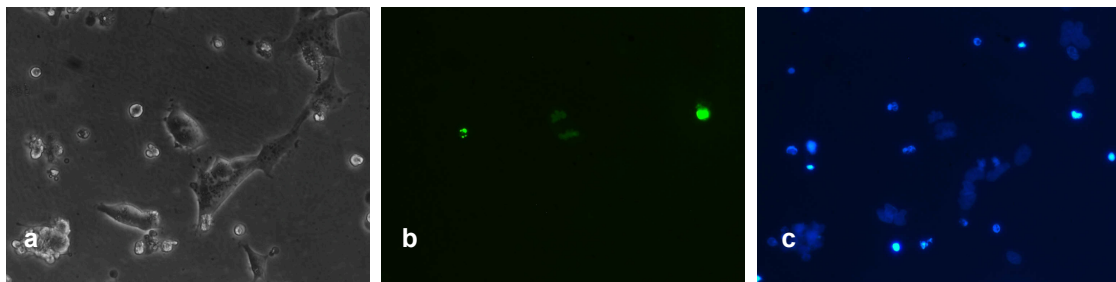


Abbildung 10: H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen: Färbung mit Höchst-Farbstoff

Dargestellt sind wieder mit dem Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB-transfizierten A673-Zellen. Aufgenommen mit 40-fach-Objektiv, Ausschnitt vergrößert. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b,c** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. **b** Es zeigt sich wieder eine Chromosomenfärbung durch H2AFB-GFP kurz nach der Chromosomentrennung. **c** Durch den Höchst-Farbstoff werden die Chromosomen der Zellen ebenso angefärbt. Zu sehen ist die in etwa äquivalente Anfärbung durch H2AFB-GFP und Höchst bei der mitotischen Zelle.

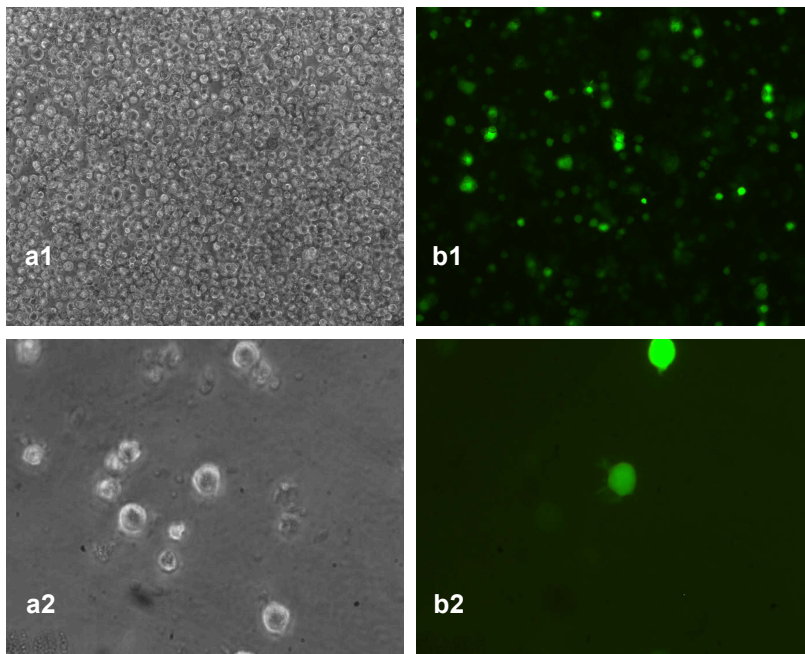


Abbildung 11: pAcGFP1-N3-Leervektor-transgene L428-Zellen

Gezeigt wird mit dem Leervektor pAcGFP1-N3 transfizierte Zelllinie L428 zwei Tage nach der Transfektion. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Aufnahme mit UV-Licht. **1** Aufgenommen mit 10-fach-Objektiv. **2** Vergrößert. In der Vergrößerung zeigt sich die zytoplasmatische Färbung durch GFP. Durch die Färbung sind die kleinen Zellausläufer der Zelllinie L428 deutlich zu erkennen

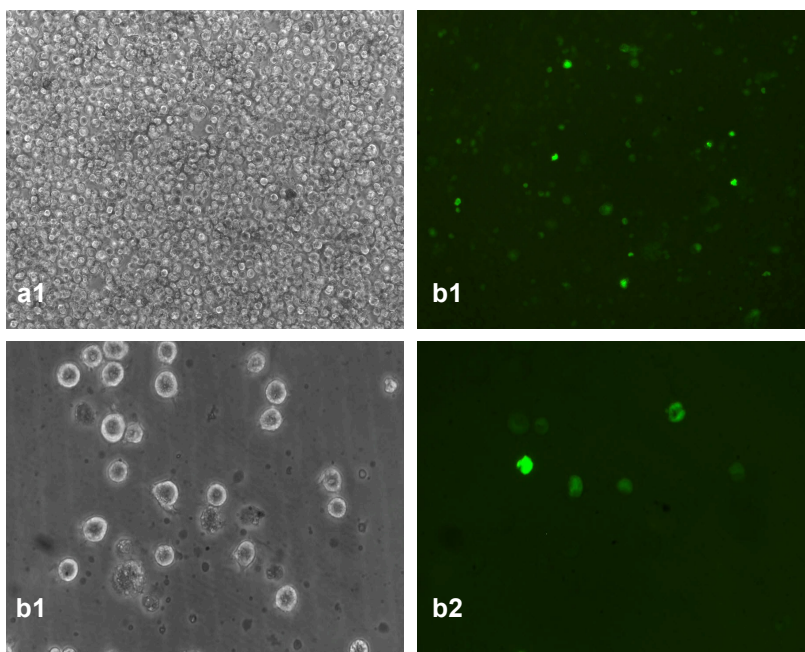


Abbildung 12: H2B-GFP-transgene L428-Zellen

Dargestellt sind mit dem Vektor pBOS-H2B-GFP-transfizierten L428-Zellen. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Aufnahme mit UV-Licht. **1** Aufgenommen mit 10-fach-Objektiv. **2** Vergrößert. Es ist eine Kernfärbung durch H2B-GFP zu erkennen.

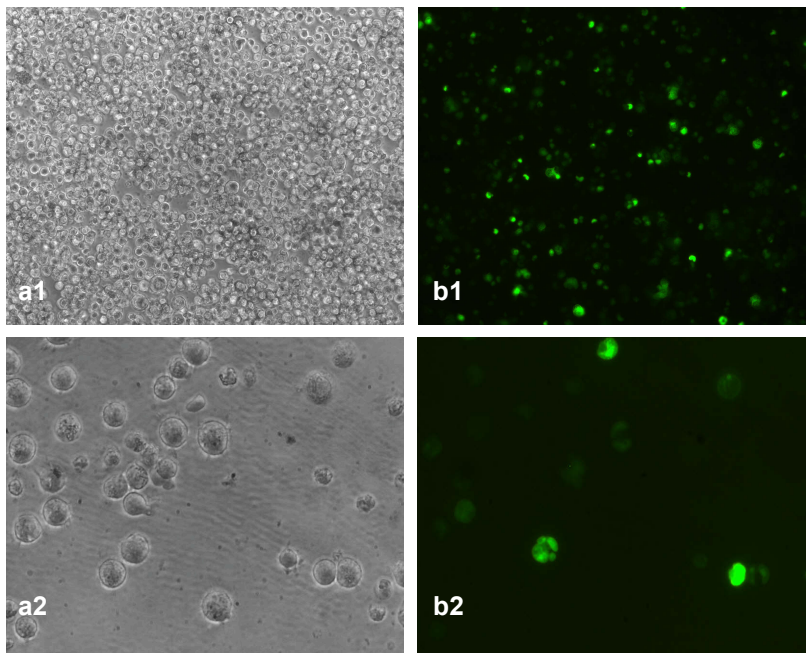


Abbildung 13: H2AFB-GFP-transgene L428-Zellen

Gezeigt ist mit dem Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB-transfizierte Zelllinie L428. **a** Phasenkontrastaufnahme. **b** Aufnahme mit UV-Licht. **1** Aufgenommen mit 10-fach-Objektiv. **2** Vergrößert. Auch hier ist eine Kernfärbung erkennbar. In der Vergrößerung zeigen sich für L428 typischen mehrkernigen Riesenzellen.

4.4 Untersuchung funktioneller Effekte transgener H2AFB-Expression

4.4.1 Zellzyklus

Für die Zellzyklusanalyse wurden die transgenen Zelllinien A673 und L428 untersucht. Um eine ausreichend hohe Expression von H2AFB zu erreichen, wurden die Experimente transient, 2 Tage nach der Transfektion, und ohne vorherige Selektion durchgeführt. Es wurden die drei Varianten des Vektors pAcGFP1-N3xH2AFB, sowie ein Leervektor pAcGFP1-N3 und zum Vergleich der gekaufte Vektor pBOS-H2B-GFP verwendet. pBOS-H2B-GFP sollte hier neben dem Leervektor als Negativkontrolle dienen, da aus ihm ein Fusionsprotein aus dem kanonischen Histon H2B und GFP gebildet wird. Die Zellen wurden transfiziert und am 2. Tag nach der Transfektion geerntet. Bei der Durchführung wurden die A673-Zellen am 1. Tag nach der Transfektion von der 6-Wellplatte in Flaschen umgesetzt, um den Zellen genügend Platz zu bieten.

Wie im Methodenteil beschrieben erfolgte die Auswertung der FACS-Daten mithilfe von zwei verschiedenen Auswertungsmethoden. Beispielfhaft sind die Gating-Strategien dieser im Folgenden dargestellt (Abb.14,15).

Modfit ist ein Programm zur Auswertung von FACS-Daten bezüglich der Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Hierzu wurden zunächst zwei Plots (Abb. 14 a,b) erstellt. Mit den Daten aus beiden Gates wurde ein Histogramm (Abb. 14 c) erstellt und die *Peaks* G0/G1 und G2/M festgelegt. Durch das Programm wurden dann angleichende Graphen unter dem Histogramm erstellt und die prozentuale Verteilung der Zellen ermittelt.

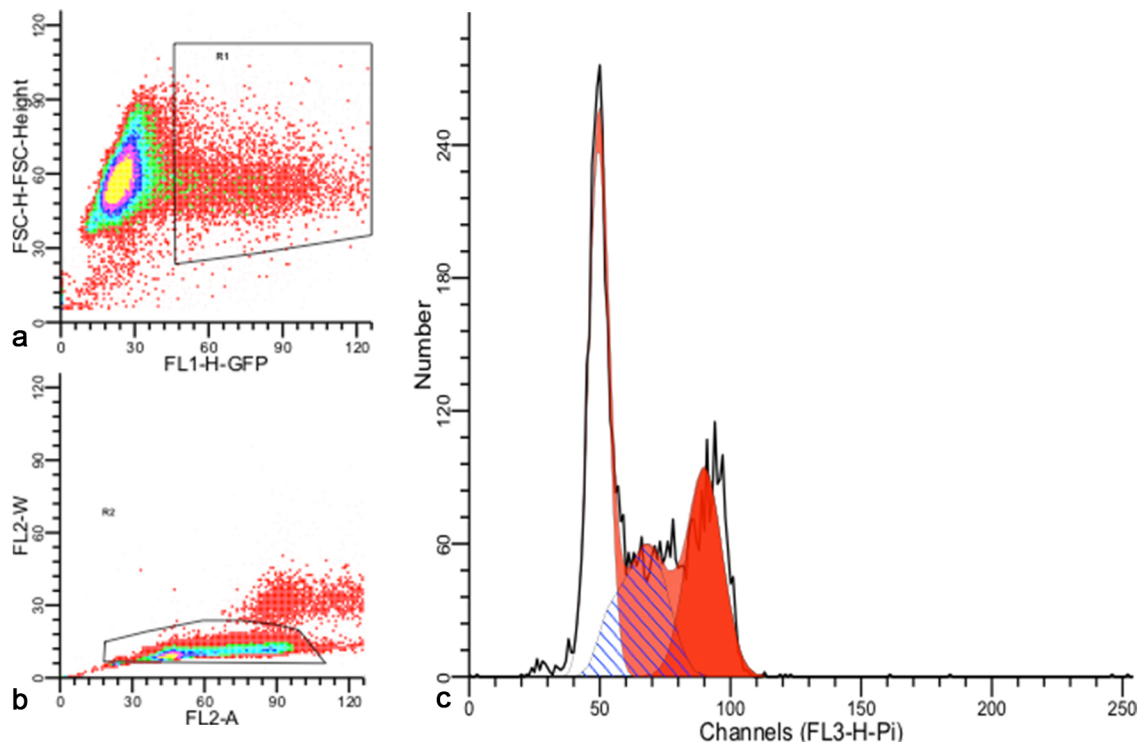


Abbildung 14: Beispiel für die Auswertung der Zellzyklusanalyse mit Modfit

a Im ersten Plot wurde FSC gegen FL-1-H-GFP gemessen und ein Gate über die stärker fluoreszierende Wolke gelegt. **b** Im zweiten Plot wurde FL2-A gegen FL2-W gemessen und mit dem Gate Zelldoubletten ausgeschlossen. **c** Histogramm mit den Daten aus beiden Gates; *Peaks* G0/G1 und G2/M manuell festgelegt, angleichende Graphen unter Histogramm durch das Programm Modfit erstellt.

Gate a (FSC gegen FL-1-H-GFP) konnte bei den Leervektor-transgenen Zellen nicht gelegt werden, da diese den Fluoreszenz-Farbstoff (GFP) während der Fixations- und Färbeschritte zu großen Teilen verloren haben. Im Fall des Leervektors wurde also die gesamte Zellpopulation der Probe betrachtet. Aufgrund der Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffes an ein Protein im Fall der anderen Vektoren bleibt die Färbung während Fixation und PI-Färbung erhalten. Zudem sind diese Fusionsproteine im Kern angesiedelt. Das freie GFP reichert sich vor allem im Zytoplasma an, was den Austritt aus der Zelle erleichtert. Bei den Leervektor-transgenen Zellen konnten daher in diesem Fall nur die Zelltrümmer ausgegattet werden.

Für die Auswertung der FACS-Daten mit Cellquest Pro wurden drei Plots erstellt (Abb. 15 a,b,c) und aus diesen zwei Histogramme gebildet (Abb. 15 d,e).

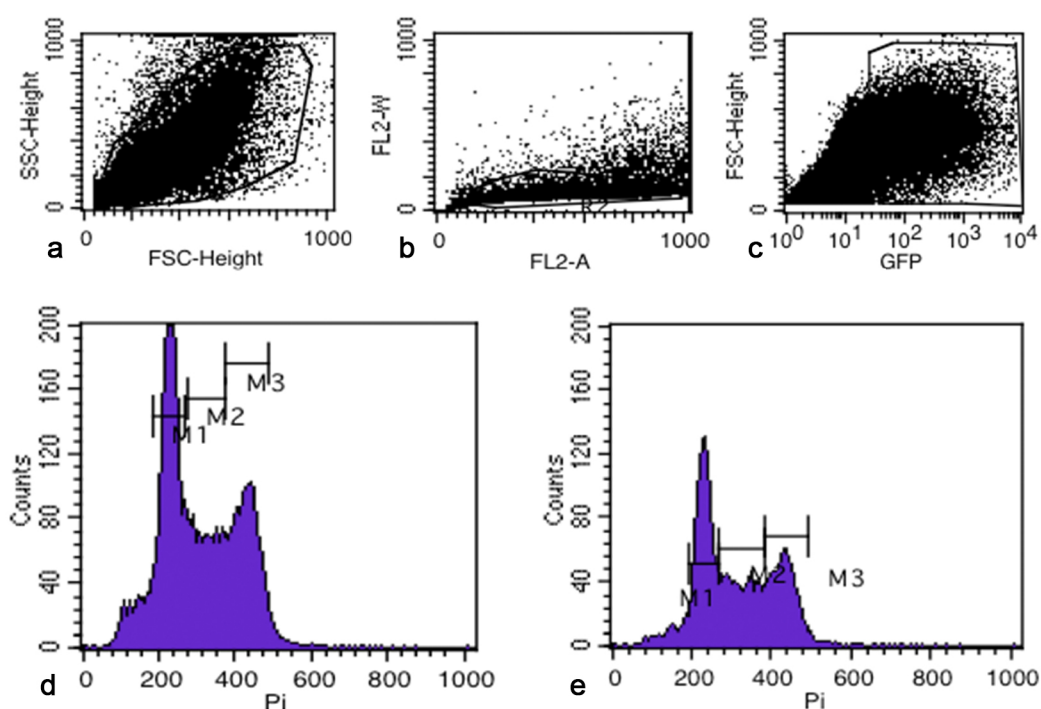


Abbildung 15:

Beispiel für die Auswertung der Zellzyklusanalyse mit Cellquest Pro

a Im ersten Plot wurde das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) gemessen. Hier wurde ein Gate gelegt, das Zelltrümmer ausschließt. **b** Im zweiten Plot wurde FL2-W gegen FL2-A gemessen und das Gate so gelegt, dass Zelldoubletten nicht mit einbezogen wurden. **c** Im dritten Plot wurde Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Fluoreszenz (GFP) gemessen. Das Gate wurde auf die stärker fluoreszierende, also transgene Population gelegt. Hieraus wurden zwei Histogramme erstellt: **d** das erste aus den Daten der Gates 1 und 2. Hier ist die Verteilung aller untersuchten Zellen, nach Ausschluss von Trümmern und Doubletten im Zellzyklus zu sehen. **e** das zweite Histogramm besteht aus den Daten der Gates 1, 2 und 3. Hier werden lediglich die grün fluoreszierenden Zellen einer Probe untersucht. In den Histogrammen stand die Anzahl der Zellen gegen die Fluoreszenz FL3-Pi. Die Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M wurden manuell markiert.

Gate c konnte bei den Leervektor-transgenen Zellen nicht gelegt werden, da diese den Fluoreszenz-Farbstoff (GFP) während der Fixations- und Färbeschritte zu großen Teilen verloren haben. Im Falle des Leervektors wurde also die gesamte Zellpopulation der Probe betrachtet. Die Messung wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Aus den Messungen wurde der Mittelwert jeder Phase bestimmt. Die Experimente wurden im Abstand von jeweils ca. zwei Wochen durchgeführt. Auffällig war, dass sich der Zellzyklus während der Versuchsreihen in Richtung Abnahme der G0/G1-Phase entwickelte. Für die Auswertung wurden, außer bei den Leervektor-transgenen Zellen, die Daten aus dem zweiten Histogramm (Abb. 15 e) verwendet. Bei letzterem konnte in den Histogrammen das GFP-Gate nicht verwendet werden.

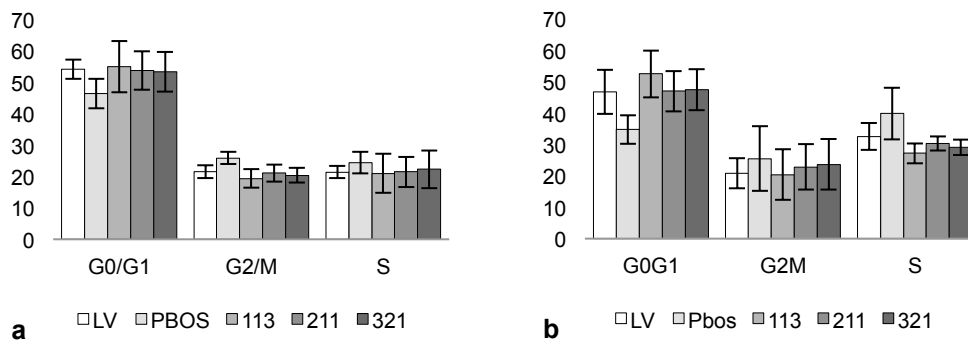


Abbildung 16: Zellzyklusanalyse A673

Dargestellt ist die Verteilung im Zellzyklus der mit den Vektoren pAcGFP1-N3 LV, pBOS-H2B-GFP, pAcGFP1-N3xH2AFB113 / xH2AFB211 / xH2AFB321 transfizierten A673-Zellen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus vier Messungen gebildet. Die Standardabweichung wurde ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt. **a** Auswertung mit dem Programm Cellquest Pro. **b** Auswertung mit dem Programm Modfit.

Beide Auswertungsverfahren zeigten in etwa gleiche Ergebnisse. Der größte Teil der A673-Zellen aller Proben befand sich in der G0/G1-Phase. Die H2B-GFP-transgenen Zellen zeigten eine signifikante Veränderung im Zellzyklus im Vergleich zu den Leervektor-transgenen Zellen (T-Test $p < 0,05$; Ausnahme Auswertung mit Modfit A673 G2/M-Phase: $p = 0,26$, S-Phase: $p = 0,27$ und L428 S-Phase: $p = 0,12$). Es zeigte sich bei ihnen eine Abnahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase bei Zunahme in G2/M und S im Vergleich zu den Leervektor-transgenen Zellen. H2AFB-GFP-transgene A673-Zellen zeigten keine auffälligen Veränderungen im Zellzyklus (Abb.16).

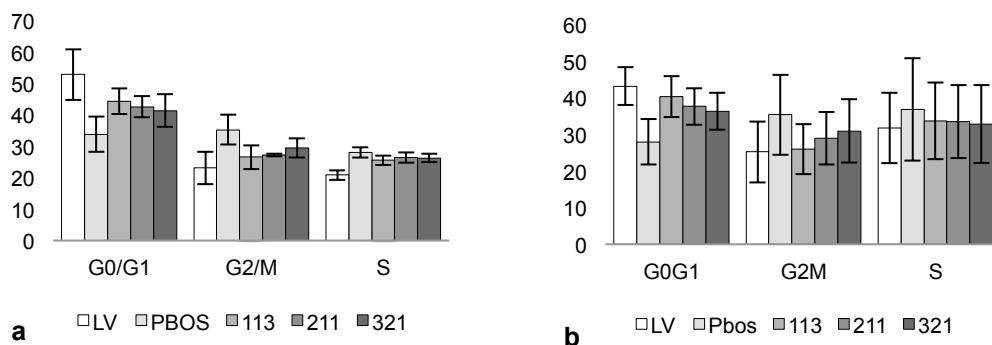


Abbildung 17: Zellzyklusanalyse L428

Dargestellt ist die Verteilung im Zellzyklus der mit den Vektoren: pAcGFP1-N3 LV, pBOS-H2B-GFP, pAcGFP1-N3xH2AFB113 / xH2AFB211 / xH2AFB321 transfizierten L428-Zellen. Wie oben wurde jeweils der Mittelwert aus vier Messungen gebildet und Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. **a** Auswertung mit dem Programm Cellquest Pro. **b** Auswertung mit dem Programm Modfit.

Auch bei den transgenen L428-Zellen konnten vergleichbare Ergebnisse der beiden Auswertungsmethoden festgestellt werden (s.o.). Im Vergleich zu den Experimenten

mit A673 war eine weniger starke Verteilung auf G0/G1 zu erkennen. Die H2B-GFP-transgenen L428-Zellen zeigten Veränderungen im Zellzyklus, wobei sich bei der Auswertung mit Cellquest Pro sogar der größte Anteil von ihnen in der S-Phase befand. Die H2AFB-GFP-transgenen L428-Zellen zeigten keine Veränderungen im Zellzyklus im Vergleich zu den Leervektor-transgenen Zellen (Abb. 17).

4.4.2 Chemotherapeutika-Resistenz

Zur Untersuchung der Chemotherapeutika-Resistenz H2AFB-transgener Zellen wurden die transgenen Zelllinien A673 und L428 untersucht. Auch die Chemotherapie-Experimente erfolgten transient. Es wurden die drei Vektorenvarianten pAcGFP1-N3xH2AFB113 / xH2AFB211 / xH2AFB321, sowie der Leervektor pAcGFP1-N3 und der Vektor pBOS-H2B-GFP verwendet. Zur Überprüfung der Auswirkung des Fusionsproteins mit GFP wurde das Experiment mit den Vektoren pIRES2-LV / xH2AFB3.2 / xH2AFB3.3, welche kein Fusionsprotein generieren, wiederholt.

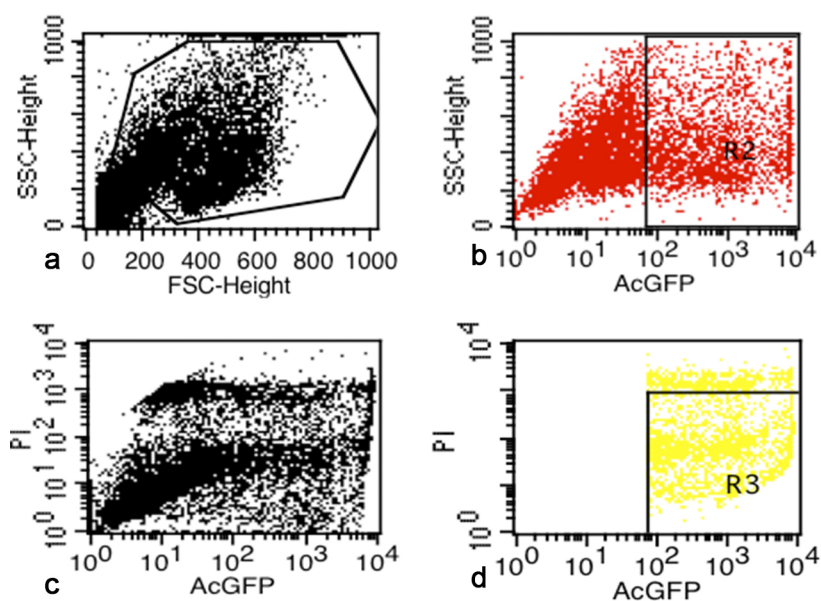


Abbildung 18:

Gatingstrategie: Anteil der grünen lebenden unter allen grünen Zellen

a Im ersten Plot wurde das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) gemessen. Mit dem Gate G1 wurden die Zellrümmer ausgegattet. Das Gate wurde auf die anderen Plots übertragen. **b** Im zweiten Plot wurde das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen die Fluoreszenz AcGFP gemessen. Das Gate G2 wurde auf die grün-fluoreszierende Wolke gelegt. Hiermit wurde der Anteil der transgenen, grün fluoreszierenden Zellen unter allen gemessen. Das Gate wurde auf Plot d übertragen. **c** Propidiumiodid 1 (PI1) wurde gegen die Fluoreszenz AcGFP gemessen. **d** Propidiumiodid 2 (PI2) wurde gegen AcGFP gemessen. Mit den Propidiumiodid-Kanälen konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Das Gate G3 wurde auf die lebenden und grün-fluoreszierenden Zellen gelegt und ermittelt so den Anteil der grün-fluoreszierenden Zellen unter allen grünen Zellen.

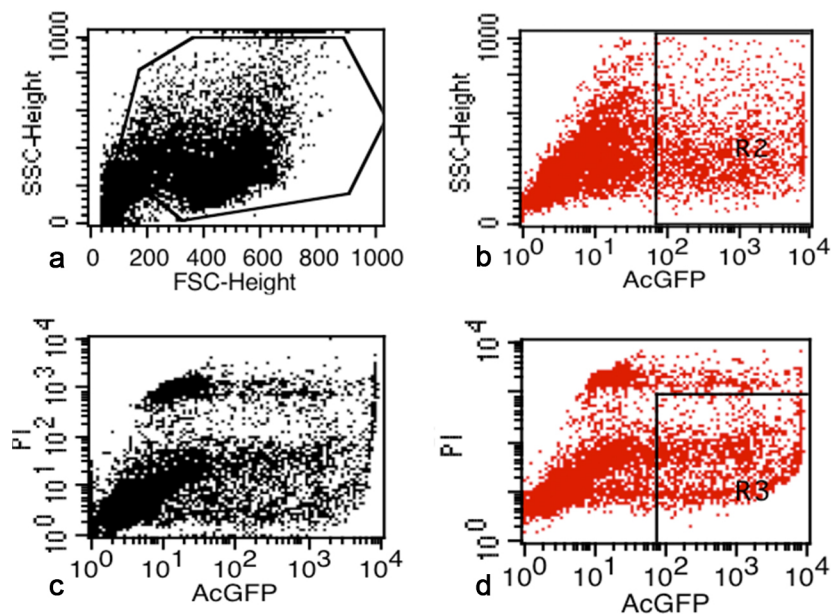


Abbildung 19: Gatingstrategie: Anteil der grünen lebenden unter allen Zellen

a Im ersten Plot wurde das Seitwärtsstreuung (SSC) gegen das Vorwärtsstreuung (FSC) gemessen. Mit dem Gate G1 wurden die Zelltrümmer ausgegated. Das Gate wurde auf die anderen Plots übertragen. **b** Im zweiten Plot wurde das Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Fluoreszenz AcGFP gemessen. Das Gate G2 wurde auf die grün-fluoreszierende Wolke gelegt. Hiermit wurde der Anteil der transgenen, grün fluoreszierenden Zellen unter allen gemessen. **c** Propidiumiodid 1 (PI1) wurde gegen die Fluoreszenz AcGFP gemessen. **d** Propidiumiodid 2 (PI2) wurde gegen AcGFP gemessen. Mit den Propidiumiodid-Kanälen konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Unterscheidung lebend/tot. Das Gate G3 wurde auf die lebenden und grün-fluoreszierenden Zellen gelegt und ermittelt so den Anteil der grün-fluoreszierenden Zellen unter allen Zellen.

Die FACS-Analysen wurden auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet. Hierbei konnte der Anteil der apoptotischen transgenen Zellen entweder über die Abnahme der lebenden Zellen unter den grün-fluoreszierenden Zellen (Abb. 18) oder über die Abnahme der lebenden grün-fluoreszierenden Zellen unter allen Zellen (Abb. 19) bestimmt werden. Die Messungen wurden drei Mal durchgeführt und der Mittelwert daraus ermittelt. Zur besseren Anschaulichkeit wurde ein Liniendiagramm erstellt (Abb. 20,21). Zum Vergleich wurden Vektoren mit und ohne Fusionsprotein untersucht.

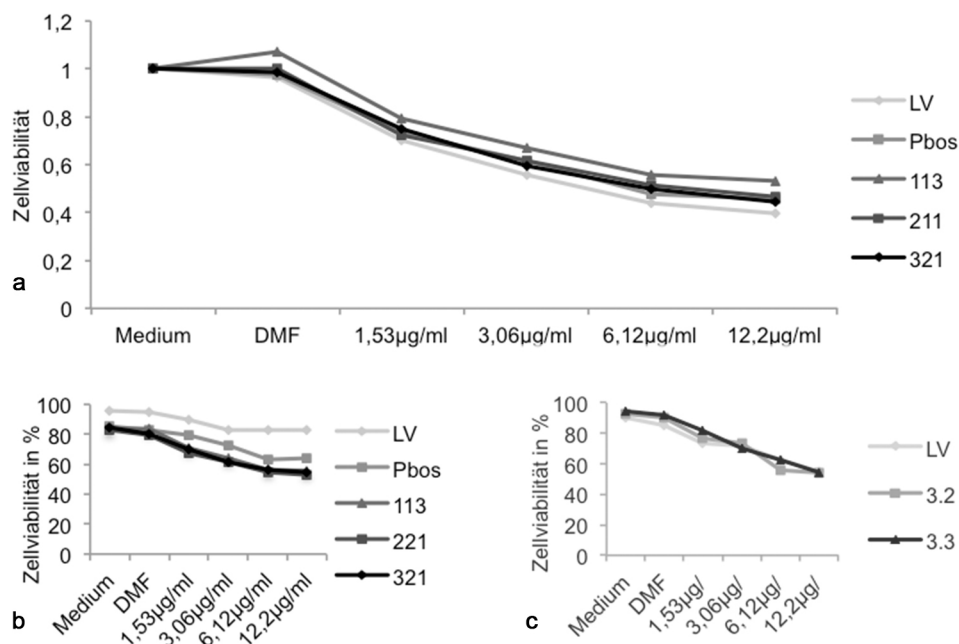


Abbildung 20: Chemotherapie-Resistenz von A673-Zellen

Dargestellt ist die Abnahme der lebenden A673-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen. Auf der x-Achse wurde die Cisplatin-Konzentration aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Viabilität der transgenen Zellen. **a** Abnahme der lebenden grün-fluoreszierenden Zellen unter allen Zellen einer Probe. Proben: mit den Vektoren pAcGFP1-N3-LV, pBOS-H2B-GFP, pAcGFP1-N3xH2AFB113, pAcGFP1-N3xH2AFB211 und pAcGFP1-N3xH2AFB321 transfizierte A673-Zellen. **b** Prozentuale Abnahme der lebenden grün-fluoreszierenden Zellen unter allen grünen Zellen. Proben wie a. **c** Transgene Zellen ohne Fusionsprotein. Abnahme aller lebenden Zellen einer Probe nach Chemotherapie-Behandlung. Proben: mit den Vektoren pIRES2-AcGFP-LV, pIRES2-AcGFPxH2AFB3.2 / xH2AFB3.3 transfizierte A673-Zellen.

Es waren keine Unterschiede zwischen den Proben hinsichtlich der Überlebensrate nach Chemotherapie-Behandlung bei der Abnahme lebender transgener Zellen unter allen ersichtlich. Dies zeigte sich sowohl bei pAcGFP1-N3-transgenen wie auch pIRES2-AcGFP-transgenen Zellen. In der Untersuchung hinsichtlich der Abnahme der grünen lebenden Zellen unter den grünen Zellen zeigten H2AFB-transgene Zellen eine stärkere Abnahme des Anteils der lebenden Zellen als H2B-GFP- und Leervektor-transgene Zellen (Abb. 20).

Bei der Zelllinie L428 zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie bei A673-Zellen, jedoch zeigten die L428-Zellen insgesamt eine stärkere Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin (Abb. 21).

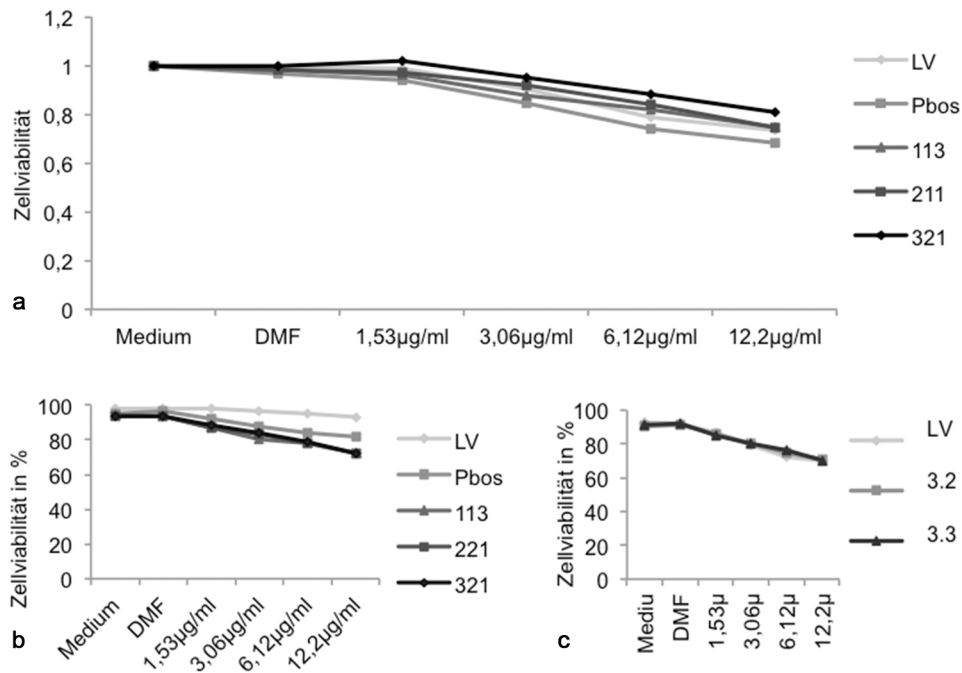


Abbildung 21: Chemotherapie-Resistenz von L428-Zellen

Dargestellt ist Abnahme der lebenden L428-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen. Auf der x-Achse wurde die Cisplatin-Konzentration aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Viabilität der transgenen Zellen. **a** Abnahme der lebenden grün-fluoreszierenden Zellen unter allen Zellen einer Probe. Proben: mit den Vektoren pAcGFP1-N3-LV, pBOS-H2B-GFP, pAcGFP1-N3xH2AFB113, pAcGFP1-N3xH2AFB211 und pAcGFP1-N3xH2AFB321 transfizierte L428-Zellen. **b** Prozentuale Abnahme der lebenden grün-fluoreszierenden Zellen unter allen grünen Zellen. Proben wie a. **c** Transgene Zellen ohne Fusionsprotein. Abnahme aller lebenden Zellen einer Probe nach Chemotherapie-Behandlung. Proben: mit den Vektoren pIRES2-LV, pIRES2-AcGFPXH2AFB3.2 / xH2AFB3.3 transfizierte L428-Zellen.

4.5 Untersuchung zur Genexpression H2AFB-transgener Zellen

4.5.1 Korrelation der Expression von H2AFB und (Humaner) Endogener Retroviren

Gene aus den Familien Humane Endogene Retroviren (HERV) K, F, W und das Endogene Retrovirus 3 (ERV3) wurden hinsichtlich ihrer Co-Expression mit H2AFB in der Quantitativen *real-time*-PCR untersucht. Hierzu wurden die Primer für HERV-K, -F, -W, HERV K1 und ERV3, H2AFB und HPRT1 als Kontrollgen verwendet. Die qRT-PCR wurde zunächst mit den unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L428, L540, HDLM2, KMH2 und L1236 durchgeführt. Im Anschluss wurden die Experimente mit verschiedenen Proben der transgenen Zellen wiederholt.

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde dem Ct-Wert des untersuchten Gens der entsprechende Ct-Wert des Kontrollgens HPRT1 einer Probe abgezogen. Aus den so entstandenen delta-Ct-Werten wurde ein Median für jedes Gen gebildet. Dieser wurde von den delta-Ct-Werten abgezogen. Die Werte wurden dann 2^{Δ} gerechnet.

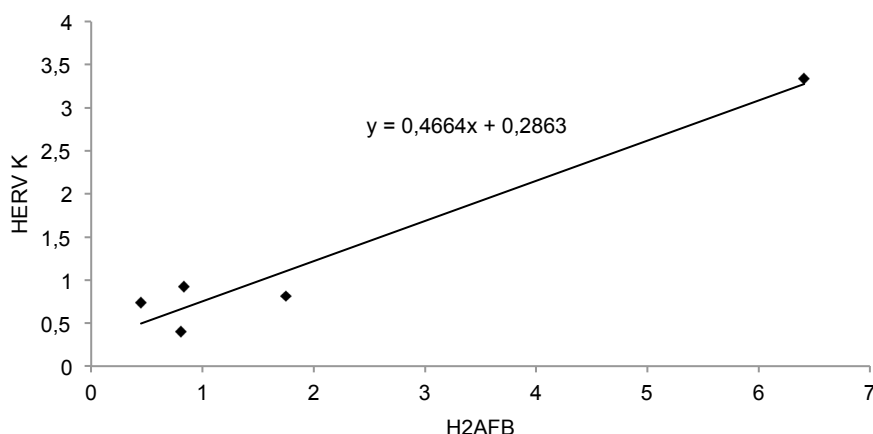


Abbildung 22: HERV-K und H2AFB in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und H2AFB in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L1236, L428, L540, HDLM2 und KMH2. Für jede Zelllinie wurde eine Dreifachbestimmung mit der selben cDNA angefertigt und der Mittelwert gebildet. Es wurde eine lineare Trendlinie gebildet.

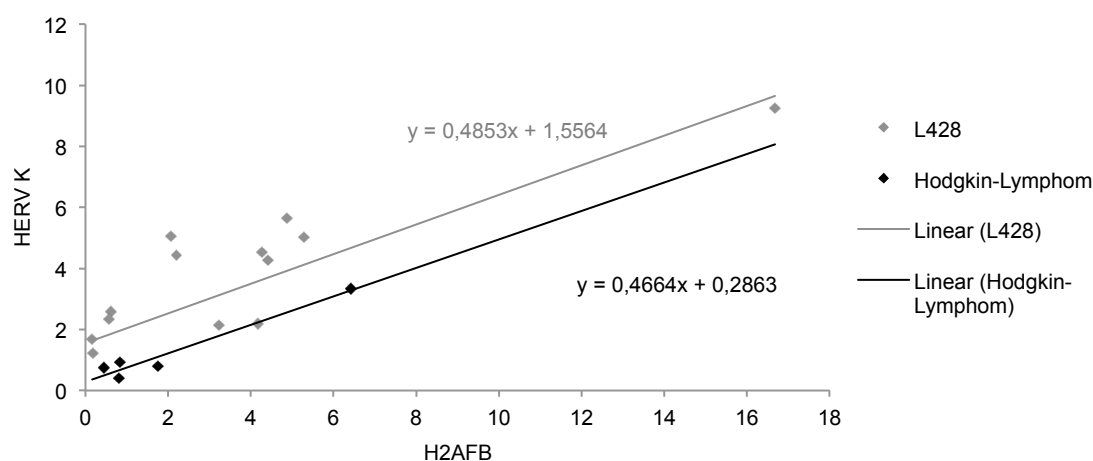


Abbildung 23: HERV-K und H2AFB in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen

Zu sehen ist die Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und H2AFB in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (schwarz) und in transgenen L428-Zellen (hellgrau). Für letztere wurde eine Einfachbestimmung je Zelllinie durchgeführt. Die cDNA stammt aus pIRES2-AcGFP-Leervektor- und pIRES2-AcGFPxH2AFB-transgenen, pAcGFP1-N3-Leervektor-, pAcGFP1-N3xH2AFB-transgenen und pBOS-H2B-GFP-transgenen L428. Um die gleiche Skalierung wie oben zu erlangen, wurde der Median der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien von dem delta-CT-Wert der transgenen L428 abgezogen und die resultierende Werte $\times 2$ gerechnet.

Es ist eine positive Korrelation zwischen der HERV-K-Expression und der Expression von H2AFB in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zu erkennen (Abb. 22). Auf eine entsprechende Korrelation sollten im Folgenden auch die H2AFB-transgenen Zellen untersucht werden. Auch für die transgenen L428-Zellen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und H2AFB (Abb. 23). Für jede Messung wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson und der nichtparametrische

Korrelationskoeffizient nach Spearman mit dem Programm SPSS bestimmt. Entsprechende p-Werte wurden mit aufgeführt. Die Korrelationskoeffizienten wurden sowohl für die einzelnen Zellgruppen (transgene L428 und unbehandelte Hodgkin-Lymphom-Zellen), als auch für beide Gruppen zusammen bestimmt (Tab. 19).

Um analoge Effekte auch in anderen Tumorarten zu überprüfen, wurden die transgenen A673-Zellen untersucht.

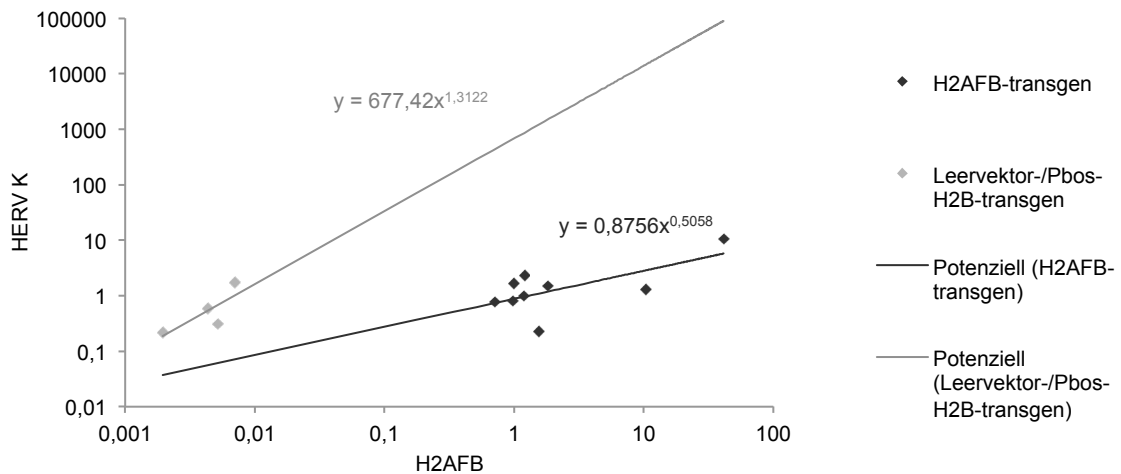


Abbildung 24: HERV-K und H2AFB in transgenen A673-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und H2AFB in transgenen A673-Zellen. Es wurde eine logarithmische Skala und potentielle Trendlinie gewählt. Die hellgraue Gruppe besteht aus den pIRES2-AcGFP-LV-, pAcGFP1-N3-LV- und pBOS-H2B-GFP-transgenen Zellen. Die schwarze Gruppe besteht aus pIRES2-AcGFPxH2AFB- und pAcGFP1-N3xH2AFB-transgenen Zellen.

Bei den transgenen A673-Zellen waren zwei Gruppen ersichtlich: die Leervektor-/H2B-transgenen mit wenig H2AFB und die H2AFB-transgenen Zellen mit einer entsprechend hohen intrazellulären Konzentration an H2AFB (Abb. 24). Einzel betrachtet haben die Gruppen eine starke Korrelation zwischen HERV-K und H2AFB als gemeinsam.

Analog dazu wurden auch Sequenzen der Humanen Endogenen Retroviren HERV-F und -W untersucht. Die zugehörigen Diagramme befinden sich im Anhang (Abb. 33-36).

Tab. 19 zeigt eine Zusammenfassung der Daten zur Untersuchung der Korrelation zwischen H2AFB und HERV-K, -F und -W in unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (HL), transgenen L428-Zellen und transgenen A673-Zellen. In der Spalte "Auswertung" sind außerdem Sparten dargestellt, die Gruppen einzeln oder gemeinsam betrachten. In der Spalte "Trendlinie" wird die Formel für die Trendlinie gezeigt. Hieraus ist eine positive oder negative Korrelation zu erkennen. Es ist der

Korrelationskoeffizient nach Pearson mit entsprechendem p-Wert und der nicht parametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman mit p-Wert dargestellt.

Tabelle 19:
Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation von HERV-K, -F und -W mit H2AFB

Korrelation mit H2AFB	Zelllinien	Auswertung	Trendlinie	Pearson Korrelation	Spearman Nicht-parametr. Korrelation	
HERV-K	HL-Zelllinien		$y = 0,4664x + 0,2863$	0,975 (p=0,005)	0,800 (p=0,104)	
	transgene L428		$y = 0,4853x + 1,5564$	0,862 (p<0,001)	0,736 (p=0,004)	
		+ HL		$y = 0,5054x + 1,2113$	0,830 (p<0,001)	0,711 (p=0,001)
	transgene A673			$y = 1,2416x^{0,126}$	0,941 (p<0,001)	0,516 (p=0,071)
		nur H2AFB		$y = 0,8756x^{0,5058}$	0,240 (p=0,534)	0,433 (p=0,244)
		nur LV+H2B		$y = 677,42x^{1,3122}$	0,978 (p=0,022)	0,800 (p=0,200)
HERV-F	HL-Zelllinien		$y = 0,5089x + 0,5671$	0,615 (p=0,007)	0,600 (p=0,285)	
	transgene L428		$y = 1,5776x + 6,138$	0,650 (p=0,016)	0,626 (p=0,022)	
		+HL		$y = 1,6151x + 4,3385$	0,615 (p=0,007)	0,507 (p=0,032)
	transgene A673			$y = 0,7832x^{0,0992}$	0,691 (p=0,009)	0,423 (p=0,150)
		nur H2AFB		$y = 0,6578x^{0,2365}$	0,111 (p=0,776)	0,800 (p=0,200)
		nur LV+H2B		$y = 31991x^{2,0111}$	0,909 (p=0,091)	0,383 (p=0,308)
HERV-W	HL-Zelllinien		$y = -0,142x + 2,031$	0,184 (p=0,767)	0,500 (p=0,391)	
	transgene L428		$y = 0,8724x + 0,3127$	0,959 (p<0,001)	0,857 (p<0,001)	
		+ HL		$y = 0,7915x + 0,4779$	0,873 (p<0,001)	0,538 (p=0,021)
	transgene A673			$y = 1,229x^{0,1991}$	0,954 (p<0,001)	0,571 (p=0,041)
		nur H2AFB		$y = 0,8756x^{0,5058}$	0,482 (p=0,178)	0,650 (p=0,058)
		nur LV+H2B		$y = 677,42x^{1,3122}$	0,987 (p=0,013)	0,800 (p=0,200)

Insgesamt zeigte sich für alle drei HERV-Familien eine mehr oder minder signifikante positive Korrelation zu H2AFB. Für HERV-W zeigte sich bei den HL-Zelllinien eine negative Trendlinie bei schwacher Korrelation, bei den transgenen L428-Zellen eine positive Korrelation.

Zudem war sowohl bei den unbehandelten und transgenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, als auch bei den transgenen A673-Zellen eine Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und HERV-F zu sehen (Tab. 20). Die Diagramme befinden sich im Anhang (Abb. 37,38).

Tabelle 20: Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation zwischen HERV-K und-F

Korrelation	Zelllinien	Trendlinie	Pearson Korrelation	Spearman Nichtparametrische Korrelation
HERV-K & -F	HL+transgene L428	$y = 3,749x - 0,4878$	0,855 ($p < 0,001$)	0,843 ($p < 0,001$)
	transgene A673	$y = 0,3592x + 0,4538$	0,809 ($p = 0,001$)	0,731 ($p = 0,005$)

Tab. 20 zeigt die Korrelation zwischen HERV-K und -F in unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (HL) und transgenen L428-Zellen, sowie in transgenen A673-Zellen. Die Trendlinien der Punktdiagramme sind angegeben. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit entsprechendem p-Wert und der nicht parametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman mit p-Wert angegeben.

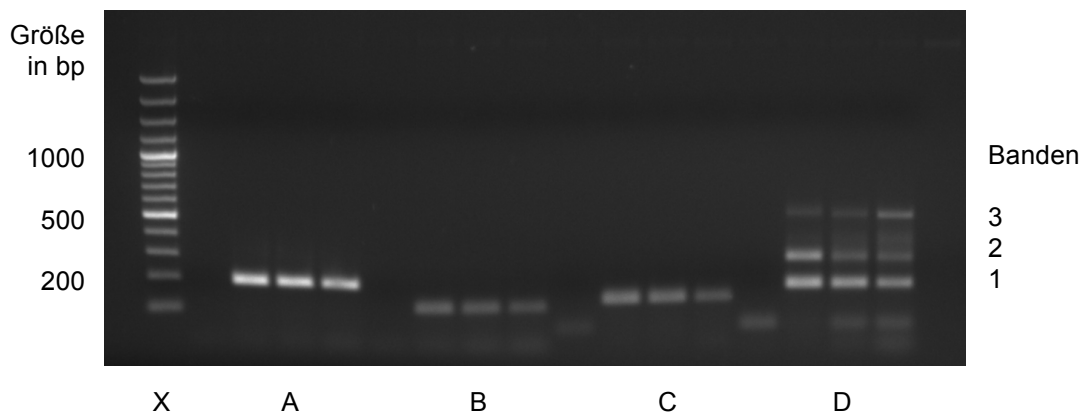


Abbildung 25: Gelelektrophorese mit HERV-K, -F, -W

Dargestellt ist eine Gelelektrophorese mit den Produkten der qRT-PCR. Die vier Cluster entsprechen den Genen (A) HPRT1, (B) HERV-W, (C) HERV-F, (D) HERV-K. Jeweils die ersten Banden ist die Probe pIRES2-AcGFP-LV-transgene A673-Zellen, dann pIRES2-AcGFPxH2AFB3.2-transgene, dann pIRES2-AcGFPxH2AFB3.3-transgene A673-Zellen. Die qRT-PCR-Produkte wurden nach Zugabe von Ladepuffer auf ein Gel aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde eine 100bp Plus-Leiter (X) benutzt.

Die Ansätze wurden nach Durchlaufen der qRT-PCR auf ein Argarosegel aufgetragen. Hier zeigte sich bei den transgenen A673-Zellen eine Veränderung des Bandenmustern bei HERV-K (Abb. 25). Diese Auffälligkeiten konnten in mehreren Versuchen festgestellt werden, jedoch nicht bei den transgenen L428-Zellen. Alle 3 Banden zeigten eine homologe Sequenz zu HERV-K-Transcripten. Die Ergebnisse der Sequenzierung finden sich im Anhang. Die Banden 2 und 3 der Leervektor-Probe ergaben am ehesten die Sequenz „HERV-K *nonfunktional envelope protein*“. (Sequence ID: KF254385.1). Bande 1 besitzt die höchste Übereinstimmung mit „Homo sapiens isolate HML-2_3q21.2 endogenous virus HERV-K, complete sequence“ (Sequence ID: JN675023.1).

Um die HERV-K-Familie weiter zu untersuchen wurden qRT-PCRs mit einer weiteren Primerkombination für HERV-K („HERV-K1“) und RNA der transgenen Zellen L428 und A673 erstellt.

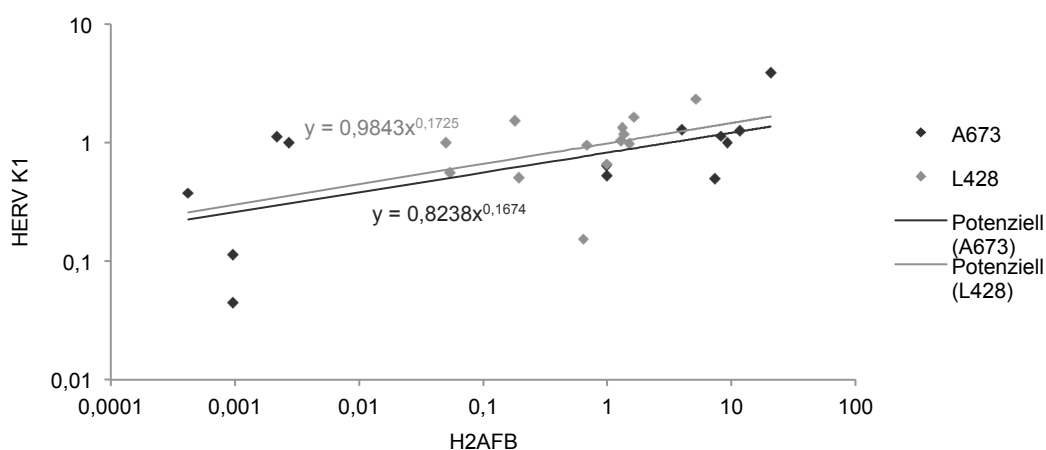


Abbildung 26: HERV-K1 und H2AFB in transgenen A673- und L428-Zellen

Korrelation zwischen HERV-K1 und H2AFB in transgenen A673-Zellen (schwarz) und L428-Zellen (hellgrau). Es wurde eine logarithmische Skalierung und potentielle Trendlinien verwendet. Es wurden die gleichen Vektoren wie oben aufgeführt verwendet.

Es zeigte sich eine positive Korrelation bei den transgenen L428- und A673-Zellen (Abb. 26). Entsprechende Korrelationskoeffizienten wurden in der Tabelle angegeben (Tab. 21).

Als weiterer Vertreter der endogenen Retroviren wurde ERV3 untersucht (Abb. 27). Auch bei ERV3 zeigte sich eine positive Korrelation zu H2AFB bei den L428-Zellen. Bei den A673-Zellen war eher keine Korrelation zu erkennen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson und der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman mit dem Programm wurden mit SPSS bestimmt (Tab. 21).

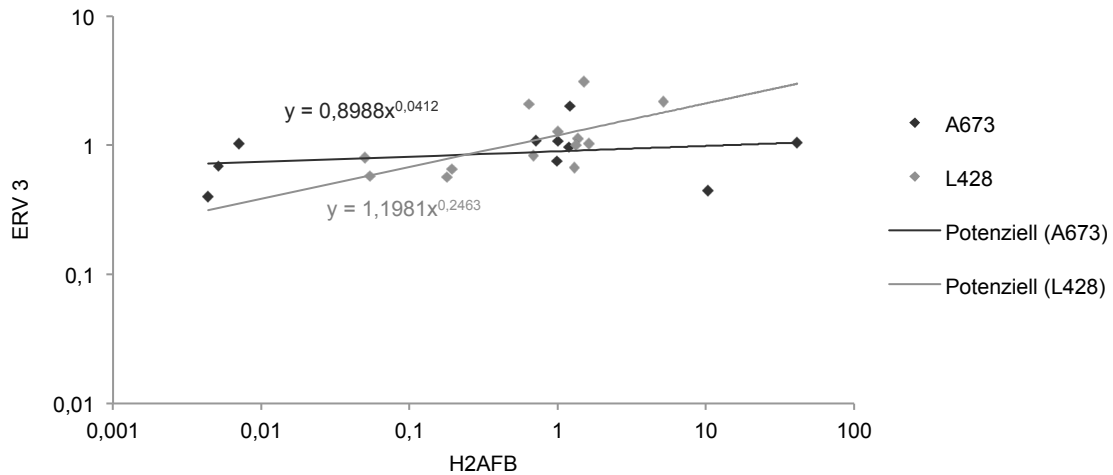


Abbildung 27: ERV3 und H2AFB in transgenen A673- und L428-Zellen

Korrelation zwischen ERV3 und H2AFB in transgenen A673-Zellen (schwarz) und L428-Zellen (hellgrau). Es wurde eine logarithmische Skalierung und potentielle Trendlinien verwendet. Es wurden die gleichen Vektoren wie oben aufgeführt verwendet.

Tabelle 21: Ergebnisse aus qRT-PCR zur Korrelation von HERV-K1 und ERV3 mit H2AFB

Korrelation mit H2AFB	Zelllinien	Trendlinie	Pearson Korrelation	Spearman Nichtparametrische Korrelation
HERV-K1	transgene L428	$y = 0,9843x^{0,1725}$	0,741 ($p=0,004$)	0,566 ($p=0,044$)
	transgene A673	$y = 0,8238x^{0,1674}$	0,830 ($p<0,001$)	0,720 ($p=0,006$)
ERV3	transgene L428	$y = 1,1981x^{0,2463}$	0,520 ($p=0,068$)	0,703 ($p=0,007$)
	transgene A673	$y = 0,8988x^{0,0412}$	0,008 ($p=0,982$)	0,358 ($p=0,310$)

Tab. 21 zeigt die Korrelation zwischen der Expression von H2AFB und HERV-K1 bzw. ERV3 in transgenen L428-Zellen sowie transgenen A673-Zellen. Die Trendlinien der Punktdiagramme sind angegeben. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit entsprechendem p-Wert und der nicht parametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman mit p-Wert angegeben. Als Primer für HERV-K wurde die Primerkombination "HERV-K1" verwendet.

In anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der ERV3-Expression und Apoptose postuliert (Michna *et al.*, 2016). Um diesen Zusammenhang in H2AFB-transgenen Zellen zu überprüfen, wurden Daten aus dem Cisplatin-Experiment zur Sterberate unbehandelter Zellen hinzugezogen (Abb. 28). Mit einem T-Test wurden Unterschiede zwischen den H2B- und H2AFB-transgenen Zellen überprüft, diese waren jedoch nicht signifikant.

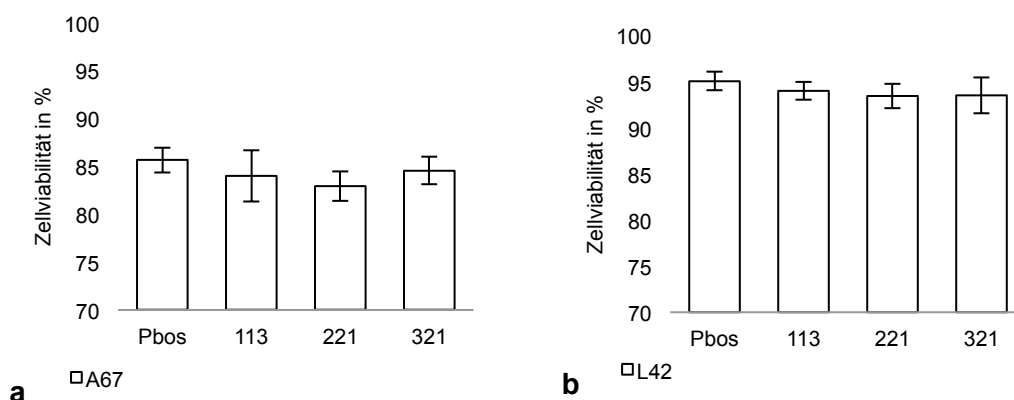


Abbildung 28: Viabilität transgener Zellen

Abnahme lebender transgener Zellen unter allen Zellen. pBOS-H2B-GFP-transgene (Pbos) im Vergleich zu pAcGFP1-N3xH2AFB-transgenen (drei Vektorvarianten 113, 211, 321) **a** A673- und **b** L428-Zellen.

4.5.2 Microarray-Analyse

Zum Vergleich der Genexpressionsprofile von H2AFB-transgenen Zellen mit der Leervektor-Kontrolle wurde eine *Microarray*-Analyse durchgeführt. Die DNA-*Microarray*-Technologie basiert auf der Hybridisierung von markierten Oligonukleotiden mit immobilisierten DNA-Sequenzen. Die DNA-Sequenzen finden sich dabei an definierten Positionen auf dem *Microarray*.

Die RNA wurde wie oben beschrieben zwei Tage nach der Transfektion aus den transgenen A673-Zellen gewonnen. Verwendet wurden pAcGFP1-N3-Leervektor-transgene und pAcGFP1-N3xH2AFB321-transgene Zellen. Die Zelllinie A673 wurde ausgewählt, weil bei ihr eine deutlichere Überexpression mit H2AFB erzeugt werden konnte als bei der Zelllinie L428. Nach der Isolation wurden Konzentration und Reinheit der Probe spektrophotometrisch bestimmt. Nach der cDNA-Synthese wurde in einer qRT-PCR die Expression von H2AFB untersucht. Es wurden die *Microarrays* „Human Transcriptome 2.0“ von Affymetrix und etwa 100 ng RNA verwendet. Die Aufbereitung der Arrays erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der Martin- Luther-Universität Halle.

Die Rohdaten wurden freundlicherweise von Herrn Martin S. Staeger in der Affymetrix Expression Console in eine Texttabelle umgewandelt. Signalintensitäten unter 100 wurden heraus genommen. Mit den übrigen Daten wurden aus den Signalintensitäten der beiden Proben die Quotienten q und q_1 gebildet. $q > 1$ steht in diesem Fall für die Überexpression bestimmter Gene mit H2AFB, $q_1 > 1$ für die Unterexpression. Untersucht wurden die *Probesets* auf *Exon*-Ebene. Mit dem Programm Genesis wurde aus den Daten der *Exon-Probesets* mit q bzw. $q_1 > 4$ eine *heat-map* erstellt (Sturn *et al.*, 2002). Diese zeigt mithilfe einer Farbcodierung die Stärke der differentiellen Expression zwischen den beiden Proben.

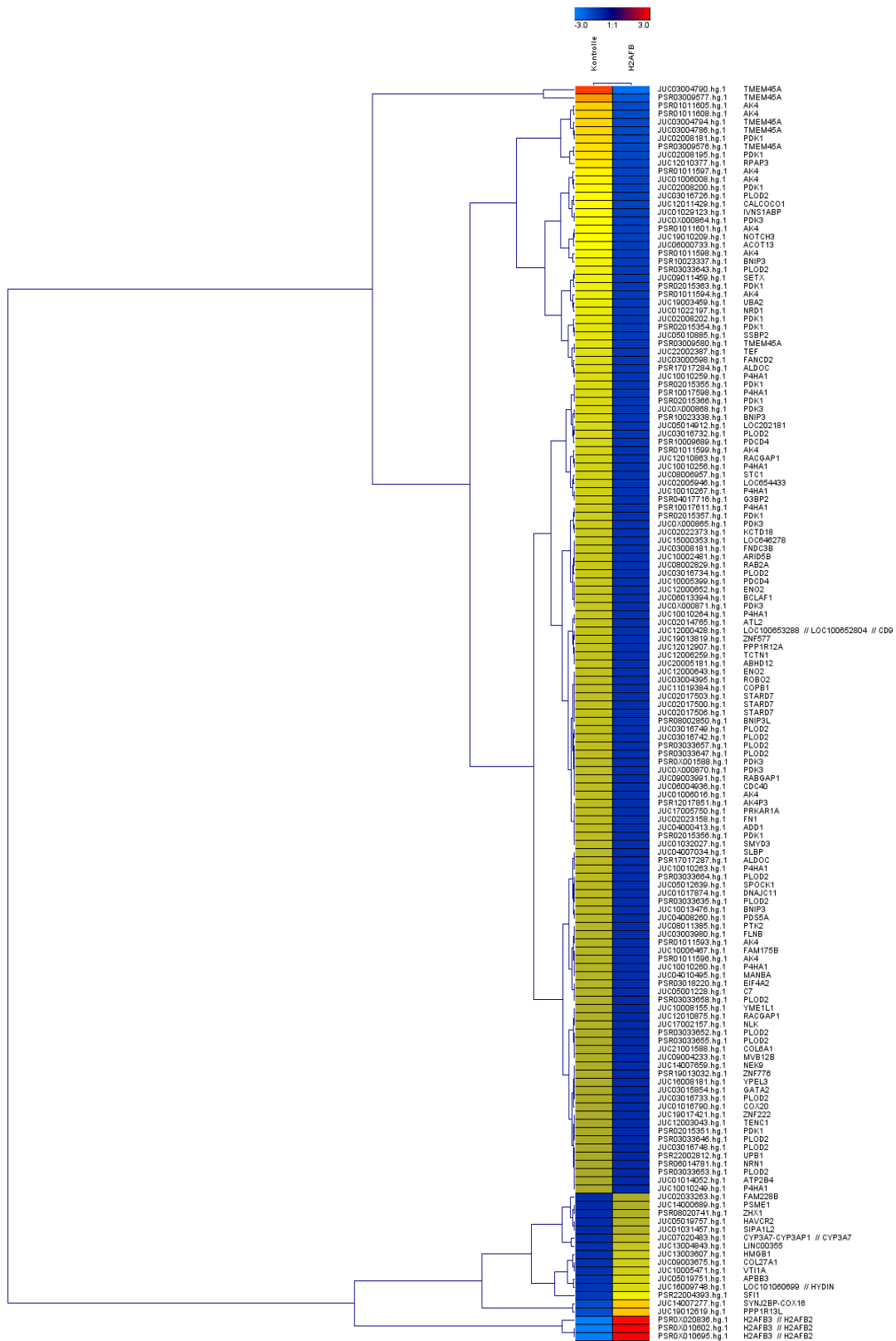


Abbildung 29: *heat-map* (Exon-Probesets) zur differentiellen Genexpression durch H2AFB

Dargestellt ist eine *heat-map* der Exon-Probesets der beiden analysierten Proben. Rot zeigt eine starke Überexpression im Vergleich zur anderen Probe, hellblau eine starke Unterexpression. Die Klammern auf der linken Seite gliedern die Gene der Probesets in Cluster. Die Daten sind logarithmiert und es wurde der Manhattan-Abstand gewählt.

Durch die Überexpression von H2AFB in A673-Zellen zeigten sich Exon-*Probesets* für 15 Gene hoch- und für 70 Gene herunterreguliert (Datenreihe siehe Anhang). Für H2AFB wurden 3 Exon-*Probesets* mit einer maximal 78,12fachen Überexpression im Vergleich zur Kontrolle gefunden (Abb. 29). Insbesondere wurden die Gene PLOD2, BNIP3, BCLAF1 und PDCD4 vermindert exprimiert und das Gen PPP1R13L bei Überexpression von H2AFB vermehrt exprimiert.

Zur Validierung der *Microarray*-Daten wurden die Gene PLOD2 und PDCD4 ausgewählt und ihre Expression in der verwendeten RNA in der qRT-PCR überprüft. Beide wurden im *Microarray*-Experiment in den H2AFB-transgenen Zellen im Vergleich zum Leervektor unterexprimiert. Ihre Exons waren in mehreren *Probesets* auffällig. Außerdem wurde ihre Co-Expression mit H2AFB in weiteren transgenen A673 und transgenen L428 überprüft. Die Ergebnisse wurden mit Daten aus der *Microarray*-Datenbank verglichen. Diagramme und Quellen befinden sich im Anhang (Abb. 39-42).

Von dem Gen PLOD2 (Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2) wurden in H2AFB-transgenen A673-Zellen 30 Exon-*Probesets* gefunden, die herunterreguliert waren. Die größte Differenz zeigte sich bei einem *Pobeset* mit 8,45fach geringerer Expression als bei den Leervektor-transgenen A673.

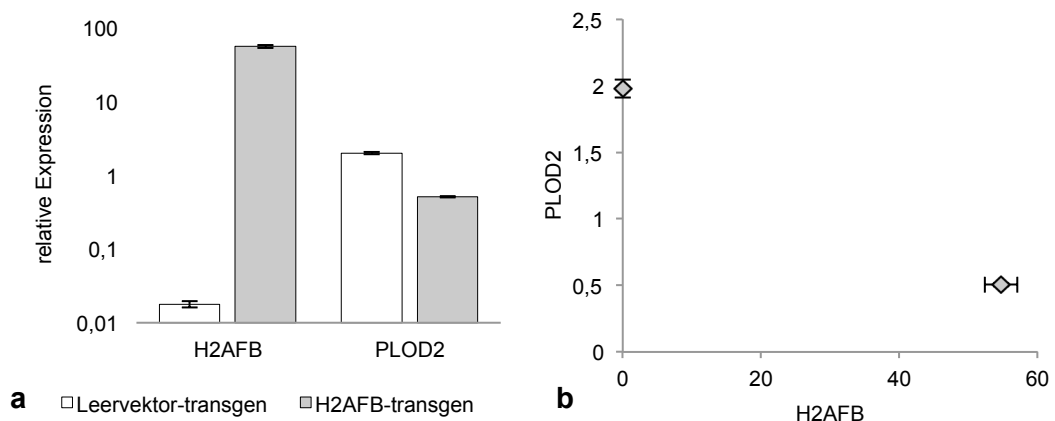


Abbildung 30: PLOD2 und H2AFB in A673-Zellen

Dargestellt ist die Expression von H2AFB und PLOD2 in den für die *Microarray*-Analysen verwendeten Zellen. Die Messwerte wurden in einer Dreifach-Bestimmung in der qRT-PCR erhoben. Es wurden Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet. **a** Expression der Gene H2AFB und PLOD2 in Leervektor-transgenen und H2AFB-transgenen A673. **b** Korrelation zwischen H2AFB- und PLOD2-Expression in diesen Zellen.

In einer qRT-PCR-Untersuchung konnte die negative Korrelation zwischen H2AFB und PLOD2 bestätigt werden (Abb. 30). Auf eine solche Korrelation wurden auch die Proben weiterer transgener A673- und L428-Zellen untersucht. Bei diesen konnte die Korrelation jedoch nicht ausreichend bestätigt werden. Ein negativer Trend zeigte sich jedoch auch in Daten aus der *Microarray*-Datenbank. Die entsprechenden Diagramme zur Korrelation in transgenen A673-Zellen und Daten aus der *Microarray*-Datenbank befinden sich im Anhang. Auf die Darstellung der Korrelation in transgenen L428-Zellen wurde der Übersicht halber verzichtet.

Von PDCD4 (*Programmed cell death protein 4*) wurden 4 Exon-Probesets gefunden, die in den H2AFB-transgenen Zellen herunterreguliert waren. Die größte Differenz war eine 5,78fach geringere Expression im Vergleich zur Kontrolle.

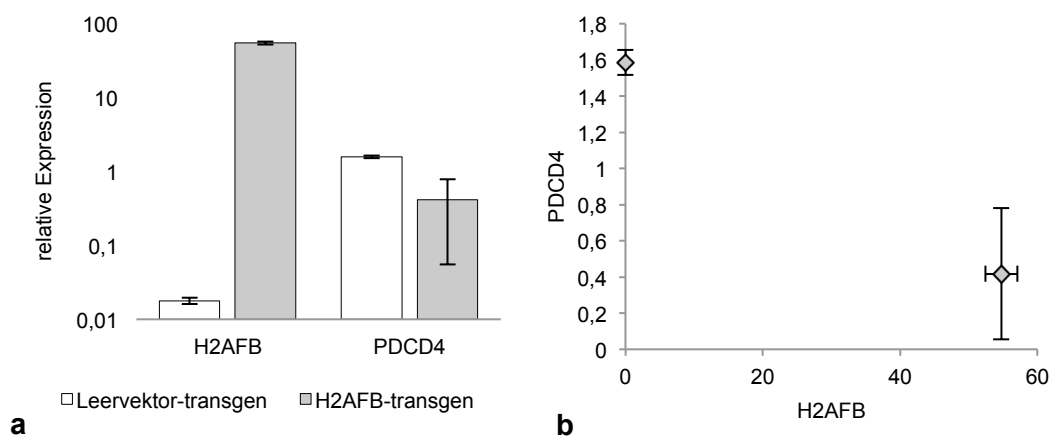


Abbildung 31: PDCD4 und H2AFB in A673-Zellen

Dargestellt ist die Co-Expression von H2AFB und PDCD4 in den für die *Microarrays* verwendeten Zellen. Die Messwerte wurden in einer Dreifach-Bestimmung in der qRT-PCR erhoben, es wurden Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet. **a** Expression der Gene H2AFB und PDCD4 in Leervektor- und H2AFB-transgenen A673-Zellen. **b** Korrelation zwischen der H2AFB- und PDCD4-Expression in diesen Zellen.

Die negative Korrelation zwischen H2AFB und PDCD4 konnte in der für den *Microarray* verwendeten RNA bestätigt werden (Abb. 31). Es zeigte sich in weiteren untersuchten Proben jedoch lediglich ein Trend zur negativen Korrelation. Auch in Daten aus einer *Microarray*-Daten-Bank mit unterschiedlichen Zellen zeigte sich ein negativer Trend. Die Diagramme für die Korrelation in transgenen A673-Zellen und Daten aus der *Microarray*-Datenbank befinden sich im Anhang. Auf die Darstellung der Korrelation in transgenen L428-Zellen wurde der Übersicht halber verzichtet.

5 Diskussion

Die Erforschung tumorspezifischer Gene spielt insbesondere für die Entwicklung neuer und gezielter Therapieansätze eine wichtige Rolle. Um das Hodgkin-Lymphom-typische Histon H2AFB in Tumorzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente zur Funktion und Genwirkung durchgeführt. Die bereits in der Literatur beschriebenen Wirkungen von H2AFB wurden mit den neu erhobenen verglichen.

5.1 Differentielle Expression von H2AFB in Tumorzellen

Bei dem initial erhobenen Screening zeigte sich, wie erwartet und von Winkler *et al.* beschrieben, die stärkste Expression von H2AFB in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und im Hoden, was der Bezeichnung *cancer/testis*-Antigen im Hodgkin-Lymphom entspricht (Winkler *et al.*, 2012). Es zeigte sich jedoch in den drei PBMC-Proben gesunder Spender ebenfalls eine höhere Expression von H2AFB im Vergleich zu den restlichen getesteten Tumorzellen. Daher ist H2AFB nicht als ein rein tumorspezifisches Antigen anzusehen und könnte für die *targeted therapy* aus diesem Grund eher problematisch sein.

Die geringste Expression von H2AFB zeigte sich in meinem Screening bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien SIMA und Kelly, wobei die dritte Neuroblastom-Zelllinie, IMR5, eher eine intermediäre Expression zeigte. Auch bei zwei der drei Ewing-Sarkom-Zelllinien, bei SKNMC und RDES, zeigte sich eine geringere Expression als bei dem Durchschnitt. Ob jedoch von einer generell geringen Expression von H2AFB in Zellen neuronalen Ursprungs auszugehen ist, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.2 Nimmt H2AFB Einfluss auf den Zellzyklus maligner Zellen?

In der Untersuchung zur Wirkung auf den Zellzyklus maligner Zellen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen durch die nicht-kanonische Histonvariante H2AFB. Weder die H2AFB-transgene Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428, noch Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 zeigte eine Veränderung im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Bei der zur Kontrolle hinzugezogenen kanonischen Histonvariante H2B konnte eine Abnahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase, bei einer Zunahme in G2/M und S, gefunden werden. Diese Ergebnisse ließen sich in zwei verschiedenen Auswertungsmethoden bestätigen und waren überwiegend signifikant. H2B sollte als natürlich vorkommende Histonvariante eigentlich keinen Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Es könnte sein, dass das Fusionsprotein mit GFP, wie es durch den verwendeten Vektor pBOS-H2B-GFP generiert wird, die Funktion und Wirkung von H2B verändert und auf

diese Weise zu den Veränderungen im Zellzyklus führt. Auf der anderen Seite könnte es auch sein, dass H2B, wenn es unnatürlich hoch exprimiert wird, zur Störung des natürlichen Verhaltens der Zelle führt. Auch H2AFB wurde in diesem Experiment als Fusionsprotein mit GFP verwendet. Es wäre daher möglich, dass das GFP die eigentliche Wirkung von H2AFB auf den Zellzyklus verfälscht. In der Literatur wurde mit ähnlichen Vektormodellen gearbeitet und davon ausgegangen, dass ein Fusionsprotein mit GFP die Wirkung von Histonen nicht verändert. Die Ergebnisse könnten somit darauf hindeuten, dass H2AFB in den untersuchten Tumorzellen keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus ausübt. Diese Deutung könnte auch mit den in der Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Phänomenen übereinstimmen, bei welchen H2AFB während der Mitose teilweise aus dem Chromatin exkludiert wurde und somit möglicherweise nicht in diese involviert ist. Die Färbung der Chromosomen in der Metaphase durch H2AFB-GFP war nur spärlich erkennbar. War eine Chromosomenteilung zu sehen, war das Zytoplasma ebenso angefärbt. Im Vergleich dazu zeigte sich eine deutliche und ausschließliche Färbung des Chromatins und eine punktuelle Anreicherung von H2AFB-GFP im kondensierten Kern. Bei den zur Kontrolle herangezogenen H2B-GFP-transgenen Zellen waren fluoreszenzmikroskopisch viele mitotische Zellen zu sehen und die einzelnen Chromosomen waren während der Zellteilung deutlich sichtbar. Diese Beobachtung könnte auf eine verlangsamte Mitose durch H2B hindeuten.

In der Literatur wurden bereits ähnliche Experimente zur Wirkung von H2AFB auf den Zellzyklus durchgeführt. Hier kam man zu unterschiedlichen Ergebnissen. Goshima *et al.* untersuchten H2AFB-EGFP-transgene HeLa-, MEF- und RPE-Zellen und stellten bei diesen einen Wachstumsdefekt und eine Apoptose-Induktion fest. Nach 48h befand sich hier eine erhöhte Population der H2AFB-EGFP-transgenen HeLa-Zellen in der sub-G1-Phase im Vergleich zu den H2A-EGFP-transgenen HeLa-Zellen (Goshima *et al.*, 2014).

Im Gegensatz hierzu konnten Sansoni *et al.* eine verkürzte S-Phase bei H2AFB-GFP-transgenen (GFP-H2A.Bbd) MEF-Zellen feststellen (Sansoni *et al.*, 2014). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in der Literatur und meinen Ergebnissen könnte auf die Menge des intrazellulär exprimierten H2AFB zurückzuführen sein. Zudem könnten die in allen drei Experimenten verwendeten unterschiedlichen Fusionsproteine mit (E)GFP unterschiedliche Einflüsse auf die Histon-Funktion nehmen. Es wäre daher sinnvoll ein ähnliches Experiment mit dem ungebundenen H2AFB-Protein durchzuführen. Außerdem könnte es sein, dass die zwei Proteinvarianten von H2AFB unterschiedliche Wirkungen auf die Zelle haben. Dies ist jedoch aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den zwei Varianten eher unwahrscheinlich.

5.3 Nimmt H2AFB Einfluss auf die Chemotherapie-Sensibilität maligner Zellen?

Das Hodgkin-Lymphom spricht sehr gut auf die etablierte Therapie an und hat daher eine sehr gute Prognose. Dennoch gibt es Patienten, die weniger gut auf die Chemotherapie-Schemata ansprechen. Um den Grund hierfür zu erforschen, sind Hodgkin-Lymphom-typische Proteine wie H2AFB von Interesse. Wie von Staeger *et al.* publiziert, zeigen verschiedene HL-Zelllinien in der Tat eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika. Während die Zelllinie L540 besonders sensibel gegenüber der Chemotherapie ist, zeigt L1236 die größte Resistenz der untersuchten Linien. Die Zelllinien HDLM2 und KMH2 zeigen eine intermediäre Chemotherapie-Resistenz (Staeger *et al.*, 2008). In dem von mir durchgeführten Screening auf H2AFB in HL-Zelllinien zeigten L1236-Zellen eine besonders hohe Expression von H2AFB, L540- und HDLM2-Zellen eine niedrige und L428- und KMH2-Zellen eine intermediäre Expression von H2AFB. Vergleicht man diese Ergebnisse, so liegt es nahe, dass eine hohe Expression von H2AFB mit einer höheren Chemotherapie-Resistenz einhergehen könnte. Um diese potentielle Wirkung von H2AFB zu validieren, wurde es in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 und der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 transgen überexprimiert. Die transgenen Zellen wurden mit Cisplatin behandelt und im FACS untersucht. Cisplatin wurde gewählt, da seine Hauptwirkung an der DNA zu finden ist und H2AFB als Histonvariante Einfluss auf die DNA-Zugänglichkeit von Substanzen haben könnte (Eastman, 1990). Es zeigte sich weder bei den H2AFB-transgenen L428-, noch A673-Zellen eine relevante Veränderung der Sensibilität gegenüber Cisplatin im Vergleich zur Kontrolle. Die dargestellten Unterschiede im Überleben H2AFB-transgener Zellen bei der ausschließlichen Betrachtung transgener Zellen (Abb. 20b, 21b) ist möglicherweise auf das Verhalten des Fluoreszenzmoleküls in apoptotischen Zellen zurückzuführen. Während sich die Fusionsproteine noch länger in apoptotischen Zellen befinden, könnte das zytoplasmatische, ungebundene GFP beim Leervektor rasch aus apoptotischen Zellen entweichen.

In der Literatur sind Ergebnisse zu finden, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-bedingten Strahlenschäden an der DNA durch H2AFB postulieren (Sansoni *et al.*, 2014). Es wäre daher interessant, die transgenen Zellen auf ihre Chemotherapie-Sensibilität bei weiteren, an der DNA-wirkenden Chemotherapeutika zu testen. Zudem könnte man den Grad der Überexpression in den Zellen durch andere Vektoren variieren.

5.4 H2AFB und endogene Retroviren

Seit einigen Jahren ist die Erforschung von Humanen Endogenen Retroviren in der Pathogenese von Tumoren von Interesse. Die Regulation von HERV-Sequenzen im Genom ist bislang weitgehend unbekannt. Da H2AFB häufig mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert zu sein scheint, liegt die Vermutung nahe, dass H2AFB das Ablesen von Genen erleichtern könnte (Ioudinkova *et al.*, 2012). Im Hodgkin-Lymphom konnte zudem bereits eine Assoziation zwischen der Derepression eines LTR mit Bezug zu Endogenen Retroviren und der Tumorentstehung gefunden werden (Lambrecht *et al.*, 2010). Erhöhte HERV-K-Transkripte scheinen in einigen Krebsarten außerdem mit einer schlechteren klinischen Prognose und kürzerem Rezidivfreien Intervall assoziiert zu sein (Giebler *et al.*, 2018).

Aus diesen Gründen wurde nach einem Zusammenhang zwischen der Expression von H2AFB und Transkripten (Humaner) Endogener Retroviren gesucht. In der Tat zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den untersuchten (H)ERV-Sequenzen und H2AFB. Die Ergebnisse waren bei den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, welche eine von Natur aus höhere H2AFB-Expression besitzen, etwas signifikanter als bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673, welche natürlich wenig H2AFB exprimiert. Bei letzterer zeigten sich zwei Gruppen: die Leervektor- bzw. pBOS-H2B-transgenen Zellen mit wenig H2AFB und die H2AFB-transgenen Zellen mit einer hohen Expression. Bei jeder Gruppe in sich genommen konnte eine stärkere positive Korrelation zwischen H2AFB und HERV-Transkripten gefunden werden. In der auf die qRT-PCR folgend durchgeführte Gelelektrophorese konnte zudem ein verändertes Bandenmuster für HERV-K in den H2AFB-transgenen A673-Zellen gefunden werden. Dies könnte dafür sprechen, dass H2AFB die Expression von HERV-Genen nicht nur steigert, sondern auch zu einer differentiellen Expression, in diesem Fall insbesondere der nicht-codierenden DNA, führt.

Betrachtet man die Gruppen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und transgene L428-Zellen getrennt, so fällt bei HERV-K auf, dass die Trendlinie für L428 zwar fast parallel zur anderen nach oben verschoben liegt. Dies könnte dafür sprechen, dass das eingebachte Fusionsprotein die DNA-Struktur im Vergleich zum natürlich vorkommenden H2AFB stärker verändert und so das Ablesen der HERV-Sequenzen weiter erleichtert. Um diesen Effekt zu überprüfen wurden 2 PIRE5-AcGFP+H2AFB-transgene Proben mitgeführt. Diese Daten reihten sich in die Wolke der Fusionsprotein-transgenen Zellen ein. So kann davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein den Einfluss von H2AFB auf die Expression von Endogenen Retroviren nicht beeinflusst.

H2AFB könnte also das Ablesen von (H)ERV-Transkripten erleichtern und verändern und somit Einfluss auf Zelle und Tumorentstehung nehmen. Eine Korrelation zwischen der HERV-K-/F-Expression und H2AFB konnte bereits in Proben von Weichteil-Sarkomen gefunden werden. Hier war die erhöhte Expression von HERV-Transkripten mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Giebler *et al.*, 2018). Da der Effekt von H2AFB bei A673 etwas weniger eindeutig zu erkennen war, könnte man annehmen, dass H2AFB weniger starken Einfluss auf die Genexpression in Zelllinien nimmt, in denen es natürlich wenig vorkommt.

Um die Effekte weiter zu validieren, müssten weitere (H)ERV-Transkripte untersucht werden. Zudem müsste überprüft werden, ob zwischen H2AFB und (H)ERV-Transkripten lediglich eine Co-Expression vorliegt oder ob ein regulatorischer Effekt von H2AFB ausgeht. Da transgene Zellen untersucht wurden, bei welchen H2AFB bereits unnatürlich hoch reguliert wurde, könnte man eher von letzterem ausgehen. Interessant wäre es auch, PBMC-Zellen, welche wie im initialen Screening eine recht hohe Expression von H2AFB zeigten, auf die Expression von (Humanen) Endogenen Retroviren zu überprüfen.

Nebenbefundlich konnte eine Korrelation zwischen der Expression von HERV-K und HERV-F gefunden werden. Die beiden HERV-Varianten könnten auf die gleiche Weise reguliert sein oder sich gegenseitig beeinflussen.

5.4.1 ERV3 und Apoptose in H2AFB-transgenen Zellen

Die ERV-Variante ERV3 könnte laut Michna *et al.* mit der Apoptose von Zellen assoziiert sein (Michna *et al.*, 2016). In meinem Experiment zeigte sich eine positive Korrelation zwischen ERV3 und H2AFB in L428. Daher wurde die Sterberate H2AFB-transgener Zellen im Vergleich zu den H2B-transgenen Zellen untersucht. Auch wenn die Graphen eine leicht erhöhte Sterberate für die H2AFB-transgenen Zellen erahnen ließen, waren die Unterschiede nicht signifikant. Dies könnte dafür sprechen, dass H2AFB die Apoptose-Induktion in Zellen verhindert. Die Beobachtung wurde lediglich nebenbefundlich im Chemotherapie-Sensibilität-Experiment gemacht und könnten noch einmal in einem spezifischen Experiment zur Erfassung der Sterberate von Zellen untersucht werden. Auch konnten in diesem Auswertungs-Verfahren nur die H2B- mit den H2AFB-transgenen Zellen verglichen werden. Es wäre daher interessant, ob sich ein Unterschied im Überleben im Vergleich zu den Leervektor-transgenen Zellen zeigt.

5.5 Einfluss von H2AFB auf die Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses von H2AFB auf die Genexpression von Tumorzellen wurde eine *Microarray*-Untersuchung mit transgenen Ewing-Sarkom-Zellen A673

erstellt. Ausgewertet wurden hauptsächlich die *Probesets* auf der Exonebene. Entgegen der Erwartungen zeigte sich bei der Mehrzahl der *Probesets* eine Unterexpression durch H2AFB. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Assoziation zu lockerem und transkriptionell aktivem Chromatin war davon auszugehen, dass die Überexpression von H2AFB eher zu einer vermehrten Expression von Genen führt (Spencer und Davie, 1999; Wolffe und Hayes, 1999; Chadwick und Willard, 2001; loudinkova *et al.*, 2012). Es konnten auch in meiner Untersuchung einige Gene gefunden werden, welche in den H2AFB-transgenen A673 im Vergleich zu den Leervektor-transgenen Zellen vermehrt exprimiert zu sein scheinen. Jedoch lässt sich davon ausgehen, dass die Wirkung von H2AFB auf das Genom nicht rein transkriptionsfördernd, sondern eher regulierend ist.

In meiner *Microarray*-Untersuchung konnten 4 Genregulationen gefunden werden, welche eine anti-apoptotische Wirkung auf die Zelle haben könnten (Abb. 29). Dies war im Einzelnen die Unterexpression der Gene BNIP3, welches für ein mitochondriales Protein codiert, und BCLAF1. Beide wirken über BCL2 pro-apoptotisch (Zhang *et al.*, 2009; Sarras *et al.*, 2010). Außerdem zeigte sich die Unterexpression von PDCD4, einem Tumorsuppressorgen (Lankat-Buttgereit und Göke, 2009). Mit H2AFB wurde das Gen PPP1R13L, welches für den p53-Inhibitor IASPP codiert, überexprimiert (Bergamaschi *et al.*, 2003). Dies könnte dafür sprechen, dass H2AFB zum Überleben von Tumorzellen und damit auch zur Malignität beiträgt.

Goshima *et al.* publizierten dem entgegen eine pro-apoptotische Wirkung von H2AFB über den NF- κ B-Signalweg (Goshima *et al.*, 2014). Diese Genwirkung konnte ich in meinem Experiment nicht feststellen. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte der Messung, die Verwendung unterschiedlicher Zellarten und eine unterschiedliche intrazelluläre Konzentration von H2AFB sein. Die *Microarray*-Untersuchung stellt eine Momentaufnahme der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation dar. Die RNA-Entnahme erfolgte bei Goshima *et al.* 8 und 16 Stunden nach der Geneinschaltung. Bei meinem Experiment führte ich die Messung 48 Stunden nach Transfektion durch. Auch unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen von H2AFB durch Unterschiede in verwendeten Vektoren könnten den Effekt auf die Zelle verändern.

Zur Validierung der *Microarrays* wurden qRT-PCRs für die beiden Gene PLOD2 und PDCD4 durchgeführt. Das Gen Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2) kodiert für eine Lysyl-Hydroxylase 2 (LH2), welche Lysin-Reste von Kollagen Typ I hydroxyliert. Die Hydroxylierung ist wichtig für die intermolekularen *cross-links* der Kollagenfasern (Puig-Hervás *et al.*, 2012). Veränderungen in der Expression und dem PLOD2-Gen spielen Rolle bei verschiedenen Krankheiten, wie dem Ehlers-

Dahnlos-Syndrom, dem Bruck-Syndrom und verschiedenen Tumoren (Walker *et al.*, 2004; Hyry *et al.*, 2009; Gilkes *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2016; Neyazi *et al.*, 2017). *Programmed cell death protein 4* (PDCD4) ist ein Tumorsuppressorgen, welches auf Chromosom 10q24 lokalisiert ist. Veränderungen in der Expression von PDCD4 konnten in verschiedenen Tumoren gefunden werden. Bei apoptotischen Zellen ist es zudem hoch reguliert. Daher wird angenommen, dass eine reduzierte Expression zum Überleben von Tumorzellen beitragen könnte (Lankat-Buttgereit und Göke, 2009; Li *et al.*, 2016).

Für beide Gene ließ sich die Unterexpression mit H2AFB in den für die *Microarrays* verwendeten Proben bestätigen. Zusätzlich wurden sie in weiteren Proben transgener A673-Zellen hinsichtlich ihrer Co-Expression mit H2AFB untersucht. Die negative Korrelation war in den anderen untersuchten Proben weniger eindeutig. Auch in der *Microarray*-Datenbank zeigte sich lediglich ein Trend zur negativen Korrelation. Zusätzlich wurden transgene L428-Zellen untersucht. Hier konnte ebenfalls keine eindeutige Korrelation gefunden werden. So lässt sich nicht ausschließen, dass sich der gefundene genregulatorische Effekt nicht auf alle Zellen übertragen lässt. Um dies vollständig auszuschließen, müsste eine größere Anzahl an Proben auf die Korrelation der Gene überprüft werden. Zudem wäre es interessant, ob von H2AFB eine tatsächliche regulatorische Wirkung auf die Gene ausgeht oder ob nur Co-Expression vorliegt.

Es wäre außerdem aufschlussreich weitere auffällige Gene aus der *Microarray*-Analyse in Zellproben zu untersuchen und so die Übertragbarkeit der genregulatorischen Effekte von H2AFB auf die einzelnen Gene zu validieren.

6 Zusammenfassung

Die Erforschung tumorspezifischer Proteine ist zur Entwicklung neuer, gezielter Therapie-Ansätze und zum Verständnis der Tumorphogenese unerlässlich. Das Hodgkin-Lymphom hat unter den malignen Erkrankungen eine besonders gute Überlebensprognose und wird fast immer im kurativen Ansatz therapiert. Dennoch und gerade wegen des häufig jüngeren Alters der HL-Patienten ist das Vermeiden von Langzeitschäden durch die Tumorthherapie und die Entwicklung neuer, gezielter und somit schonender Therapieansätze von besonderem Interesse.

H2AFB ist eine nicht-kanonische Histonvariante von H2A, deren Funktion nicht vollständig geklärt ist und die vermehrt in Hodgkin-Lymphom-Zellen zu finden ist.

In dieser Arbeit konnte H2AFB als Hodgkin-Lymphom-typisches Histon und *cancer/testis*-Antigen bestätigt werden. Jedoch scheint es auch in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes höher exprimiert zu werden und somit nicht rein Hodgkin-Lymphom-spezifisch zu sein. Um den Einfluss der nicht-kanonischen Histonvariante auf die Zelle zu überprüfen, wurden transgene Zellen auf ihren Zellzyklus untersucht. Anders als bei den H2B-transgenen Zellen konnten bei den H2AFB-transgenen Zellen keine Veränderungen im Zellzyklus gefunden werden. Durch Beobachtung der Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass H2AFB zumindest während der Zellteilung nicht nur mit Chromatin assoziiert vorliegt.

Aufgrund der Analogie zwischen der in der Literatur bekannten Chemotherapie-Sensibilität und der Verteilung von H2AFB in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass H2AFB Einfluss auf die Chemotherapie-Sensibilität nimmt. Dies konnte sich jedoch im Experiment mit H2AFB-transgenen Zellen nicht eindeutig bestätigen.

Die genregulatorische Wirkung des Histons H2AFB war ebenso von Interesse. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen H2AFB und der Expression von Endogenen Retroviren, deren Regulation und Wirkung auf die Zelle noch nicht vollständig geklärt sind und die in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden können. H2AFB scheint zudem regulierend auf das Genom zu wirken. Entgegen der in der Literatur angenommenen rein transkriptions-fördernden Wirkung konnte in meiner *Microarray*-Untersuchung eine depressive Wirkung auf einige Gene festgestellt werden.

Insgesamt stellt H2AFB somit ein interessantes Forschungsobjekt dar und es ist offen, ob es für neue Therapieansätze geeignet sein könnte. Aufgrund seiner regulatorischen Wirkung auf Zelleigene und Gene Endogener Retroviren könnte H2AFB eine Erklärung für die Entstehung und Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms darstellen. In diesem Zusammenhang wären auch klinisch-prognostische Studien zu H2AFB bei Hodgkin-Lymphom- und anderen Krebspatienten und beispielsweise der Zusammenhang mit (Humanen) Endogenen Retroviren von Interesse.

7 Literaturverzeichnis

Ansell S M (2014) Hodgkin lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 89: 771-779.

Arents G, Moudrianakis E N (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11170-11174.

Arents G, Moudrianakis E N (1993) Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10489-10493.

Baharvand M, Mortazavi H (2014) Characteristics of Hodgkin Lymphoma in a Defined Group of Iranian Pediatric Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 5167-5169.

BD. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2002 <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
Abgerufen am 21.09.2017

Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil N J, Trigiant G, Crook T, Hsieh J K, O'Connor D J, Zhong S, Campargue I, Thomlinson M L, Kuwabara P E, Lu X (2003) iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet.* 33: 162-167.

Chadwick B P, Willard H F (2001) A Novel Chromatin Protein, Distantly Related to Histone H2A, Is Largely Excluded from the Inactive X Chromosome. *J Cell Biol* 152: 375-384.

Chang K L, Albuja P F, Chen Y-Y, Johnson R M, Weiss L M (1993) High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 81: 496-501.

Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP (2009) Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 15: 777-791.

Clarke C A, Morton L M, Lynch C, Pfeiffer R M, Hall E C, Gibson T M, Weisenburger D D, Martinez-Maza O, Hussain S K, Yang J, Chang, E T, Engels E A (2013) Risk of lymphoma subtypes after solid organ transplantation in the United States. *Cancer Res* 9: 280-288.

Coleman and Roberts (2004) Re: Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 148: 86.

Costanzi C, Pehrson JR (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393: 599-601.

Dewannieux M, Heidmann T (2013) Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr Opin Virol* 3: 646-656.

Dupressoir A, Lavialle C, Heidmann T (2012) From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33: 663-671.

Drexler H G (1993) Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 9: 1-25.

Eastman A (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2: 275-280.

Eirin-Lopez J M, Ishibashi, T, Ausio, J (2008) H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *FASEB J.* 22: 316-326.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D M, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359-E386.

Fulwyler M J (1974) Status quo in flow-through cytometry. *J Histochem Cytochem* 22: 605-606.

Galli U M, Sauter M, Lecher B, Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2005) Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 24: 3223-3228.

Giebler M, Staeger M S, Bauschmidt S, Ohm L I, Kraus M, Würfl P, Taubert H, Greither T (2018) Elevated HERV-K expression in soft tissue sarcoma is associated with worsened relapse-free survival. *Frontiers in Microbiology* Volume 9: 211.

Gilkes D M, Bajpai S, Wong C C, Chaturvedi P, Hubbi M E, Wirtz D, Semenza G L (2013) Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 11: 456-466.

Glaser S L, Lin R J, Stewart S L (1997) Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 70: 375-382.

Gobbi P G, Ferreri A J M, Ponzoni M, Levis A (2013) Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 85: 216-237.

Goshima T, Shimada M, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, Nakanishi M (2014) Mammal-specific H2A variant, H2ABbd, is involved in apoptotic induction via activation of NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem.* 289: 11656-11666.

Griffiths D J (2001) Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* 2: REVIEWS1017.

Hasenclever D, Diehl V, Armitage J O, Assouline D, Björkholm M, Brusamolino E, Canellos G P, Carde P, Crowther D, Cunningham D, Eghbali H, Ferm C, Fisher R I, Glick J H, Glimelius B, Gobbi P G, Holte H, Horning S J, Lister T A, Longo D L, Mandelli F, Polliack A, Proctor S J, Specht L, Sweetenham J W, Vaughan Hudson G (1998) A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International prognostic factors project on advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 339: 1506-1514.

Herbst H, Steinbrecher E, Niedobitek G, Young L S, Brooks L, Müller-Lantzsch N, Stein H (1992) Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 80: 484-491.

Herold G: Innere Medizin 2014. Gerd Herold, Köln, 2014, S. 71.

Hughes JF, Coffin JM (2005) Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. *Genetics* 171: 1183-1194.

Hyry M, Lantto J, Myllyharju J (2009) Missense mutations that cause Bruck syndrome affect enzymatic activity, folding, and oligomerization of lysyl hydroxylase 2. *J Biol Chem* 284: 30917-30924.

Ichimura S, Mita K, Zama M (1982) Essential role of arginine residues in the folding of deoxyribonucleic acid into nucleosome cores. *Biochemistry* 21: 5329-5334.

Ioudinkova E S, Barat A, Pichugin A, Markova E, Sklyar I, Prizhkova I, Robin C, Lipinski M, Ogryzko V, Vassetzky Y S, Razin S V (2012) Distinct distribution of ectopically expressed histone variants H2A.Bbd and MacoH2A in open and closed chromatin domains. *PLoS One* 7: e47157

Kanda T, Sullivan K F, Wahl G M (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 8: 377-385.

Kapatai G, Murray P (2007) Contribution of the Epstein-Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol* 60: 1342-1349.

Kassiotis G (2014) Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J Immunol* 192: 1343-1349.

Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann M-L (1994) Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10962-10966.

Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, Lenza D, Köchert K, Bouhler MA, Richter J, Soler E, Stadhouders R, Jöhrens K, Wurster KD, Callen D F, Harte M F, Giefing M, Barlow R, Stein H, Anagnostopoulos I, Janz M, Cockerill P N, Siebert R, Dörken B, Bonifer C, Mathas S (2010) Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med* 16: 571-179

Lamprecht B, Bonifer C, Mathas S (2010) Repeat element-driven activation of proto-oncogenes in human malignancies. *Cell Cycle* 9: 4276-4281.

Lander E S, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Landgren O, Engels E A, Pfeiffer R M, Gridley G, Møller M, Olsen J H, Kerstann K F, Wheeler W, Hemminki K, Linet M S, Goldin L R (2006) Autoimmunity and Susceptibility to Hodgkin Lymphoma: A Population-Based Case-Control Study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst* 98: 1321-1330.

Lankat-Buttgereit B, Göke R (2009) The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell* 101: 309-317.

Li L, Feng T, Lian Y, Zhang G, Garen A, Song X (2009) Role of human noncoding RNAs in the control of tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12956-12961.

- Li J Z, Gao W, Ho W K, Lei W B, Wei W I, Chan J Y, Wong T S (2016) The clinical association of programmed cell death protein 4 (PDCD4) with solid tumors and its prognostic significance: a meta-analysis. *Chin J Cancer* 35: 95.
- Lister T A, Crowther D, Sutcliffe S B, Glatstein E, Canellos G P, Young R C, Rosenberg S A, Coltman C A, Tubiana M (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds Meeting. *J Clin Oncol* 7: 1630- 1636.
- Livak K J, Schmittgen T G (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
- Luger K, Mader A W, Richmond R K, Sargent D F, Richmond T J (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
- Luger K, Richmond T J (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8: 140-146.
- Maggioncalda A, Malik N, Shenoy P, Smith M, Sinha R, Flowers C R (2011) Clinical, Molecular, and Environmental Risk Factors for Hodgkin Lymphoma. *Adv Hematol* 2011: 736261.
- Martínez-Ramírez A, Rodríguez-Perales S, Meléndez B, Martínez Delgado B, Urioste M, Cigudosa J C, Benítez J (2003) Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 141: 138-42.
- Michna A, Schötz U, Selmsberger M, Zitzelsberger H, Lauber K, Unger K, Hess J (2016) Transcriptomic analyses of the radiation response in head and neck squamous cell carcinoma subclones with different radiation sensitivity: time-course gene expression profiles and gene association networks. *Radiat Oncol* 11: 94.
- Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Nakagawa M, Enokida H (2016) Tumor-suppressive miRNA-26a-5p and miR26b5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 115: 354-363.
- Mizushima S, Nagata S (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18: 5322.
- Müschen M, Rajewsky K, Bräuninger A, Baur A S, Oudejans J J, Roers A, Hansmann M-L, Küppers R (2000) Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T Cell Lymphoma. *J Exp Med* 191: 387-394
- National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2014; 2015 https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/browse_csr.php?sectionSEL=9&pageSEL=sect_09_table.07.html#a
Abgerufen am 19.09.2017
- Naylor J A, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F (1995) Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 4: 1217-1224.
- Neyazi B, Tanrikulu L, Wilkens L, Hartmann C, Stein K P, Dumitru C A, Sandalcioglu I E (2017) Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 expression in brain arteriovenous malformations and its association with brain arteriovenous malformation size. *World Neurosurg* 102: 79-84.

Ng A K, Bernardo M P, Weller E, Backstrand K H, Silver B, Marcus K C, Tarbell N J, Friedberg J, Canellos G P, Mauch P M (2002) Long-term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *J Clin Oncol* 20: 2101-2108.

Niwa O, Yokota Y, Ishida H, Sugahara T, Lasneret J, Martin D M, Clift S, Cohen S (1983) Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* 32:1105-1113.

Oki Y, Younes A (2010) Does rituximab have a place in treating classic Hodgkin lymphoma? *Curr Hematol Malig Rep* 5: 135-139.

Pehrson J R, Fried V A (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257: 1398-1400.

Promega. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual; 2015 <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>
Abgerufen am 19.09.2017

Puig-Hervás M T, Temtamy S, Aglan M, Valencia M, Martínez-Glez V, Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Ashour A M, Amr K, Pulido V, Guillén-Navarro E, Lapunzina P, Caparrós-Martín J A, Ruiz-Perez VL (2012) Mutations in PLOD2 cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome--osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 33: 1444-1449.

Punnett A, Tsang R W, Hodgson D C (2010) Hodgkin lymphoma across the age spectrum: Epidemiology, Therapy, and Late Effects. *Semin Radiat Oncol* 20: 30-44

Ramakrishnan V (1997) Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct* 26: 83-112.

Roswall N, Olsen A, Christensen J, Rugbjerg K, Møller L (2008) Social inequality and incidence of and survival from Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma and leukaemia in a population-based study in Denmark, 1994– 2003. *Eur J Cancer* 44: 2058-2073.

Rowlings P A, Curtis R E, Passweg J R, Deeg J, Socié G, Travis L B, Kingma D W, Jaffe E S, Sobocinski K A, Horowitz M M (1999) Increased Incidence of Hodgkin's Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 17: 3122-3127

Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2008) Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 3366-3382.

Sansoni V, Casas-Delucchi C S, Rajan M, Schmidt A, Bönisch C, Thomae A W, Staeger M S, Hake S B, Cardoso M C, Imhof A (2014) The histone variant H2A.Bbd is enriched at sites of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 42: 6405-6420

Sarras H, Alizadeh Azami S, McPherson J P (2010) In search of a function for BCLAF1. *ScientificWorldJournal* 10: 1450-1461.

Scanlan M J, Gure A O, Jungbluth A A, Old L J, Chen Y-T (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188: 22-32.

- Schaadt M, Fonatsch C, Kirchner H, Diehl V (1979) Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut* 38: 185-90.
- Spencer V A, Davie J R (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 240: 1-12.
- Staeger M S, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D (2008) Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol* 36: 886-896.
- Staeger M S, Kewitz S, Bernig T, Kühnöl C, Mauz-Körholz C (2015) Prognostic Biomarkers for Hodgkin Lymphoma. *Pediatric Hematology and Oncology* 32: 433-54.
- Staeger M S, Max D (2009) Genetics and epigenetics of the TET-ETS Translocation network. *Genet Epigenet* 2: 1-15.
- Stathis A, Younes A (2015) The new therapeutical scenario of Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology* 26: 2026–2033.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208.
- Talbert P B, Henikoff S (2010) Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 11: 264-275.
- Teicher B A, Bagley R G, Rouleau C, Kruger A, Ren, Y, Kurtzberg L (2011) Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models. *Ann Saudi Med* 31: 174-182.
- Walker L C, Teebi A S, Martini J C, De Paepe A, Malfait F, Atwasuwan P, Yamauchi M, Yeawell H N (2004) Decreased expression of lysyl hydroxylase 2 (LH2) in skin fibroblasts from three Ehlers-Danlos patients does not result from mutations in either the coding or proximal promoter region of the LH2 gene. *Mol Genet Metab* 83: 312-321.
- Weinreb M, Day P J R, Niggli F, Green E K, Nyong'o A O, Othieno-Abinva N A, Riyat M S, Raafat F, Mann J R (1996) The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood* 87: 3828-3836.
- Winkler C, Steingrube D S, Altermann W, Schlaf G, Max D, Kewitz S, Emmer A, et al. (2012) Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigenspecific immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 61: 1769-1779.
- Wirth A, Seymour J F, Hicks R J (2002) Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography, gallium-67 scintigraphy, and conventional staging for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Med* 112: 262-268.
- Wolffe A P, Hayes J J (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27: 711–720.
- Wu T C, Mann R B, Charache P, Hayward S D, Staal S, Lambe B C, Ambinder R F (1990) Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 46: 801–804.

Zhang L, Li L, Liu H, Borowitz J L, Isom G E (2009) BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion. *FASEB J* 23: 3405-3414.

Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe 2015
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
Abgerufen am 19.09.2017

Zhou J, Fan J Y, Rangasamy D, Tremethick D J (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14: 1070-1076.

Zlatanova J, Bishop T C, Victor J M, Jackson V, van Holde K (2009) The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* 17: 160-171.

8 Thesen

1. H2AFB ist ein Hodgkin-Lymphom-assoziiertes Histon und ein *cancer/testis*-Antigen.
2. H2AFB wird zusätzlich in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes erhöht exprimiert und ist somit nicht rein Hodgkin-Lymphom-spezifisch.
3. H2AFB hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Cisplatin-Chemotherapie-Sensibilität betrachteter Zellarten.
4. H2AFB hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus betrachteter Zellarten.
5. H2AFB wird während der Chromosomenteilung teilweise aus dem Chromatin exkludiert.
6. H2AFB befindet sich bei kondensiertem Chromatin nur im Zellkern und reichert sich dort punktuell an.
7. H2AFB korreliert positiv mit der Expression Endogener Retroviren.
8. H2AFB nimmt regulatorischen Einfluss auf die Genexpression von Tumorzellen.
9. H2AFB führt bevorzugt zur Herunterregulierung verschiedener Gene in der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673.
10. H2AFB führt zur Unterexpression von PLOD2 und PDCD4 in der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673.

9 Anhang

9.1 Basensequenzen für Genvarianten H2AFB

H2AFB liegt an 3 verschiedenen Loci auf Chromosom Xq28 mit jeweils leichten Veränderungen in der Basenabfolge im Genom vor. Die Unterschiede wurden unterstrichen. Die Sequenz von H2AFB1 und 3 unterscheidet sich nur in einer Aminosäure. H2AFB2 besitzt zusätzliche 73bp vor H2AFB1 und 3. Diese liegen jedoch im nicht-kodierenden Bereich. Ansonsten besitzt H2AFB2 die Sequenz von H2AFB3.

Referenzsequenzen:

H2AFB1 (Gene ID: 474382)

```

1  cgcccagcat gccgaggagg aggagacgcc gagggtcctc cggtgctggc ggccgggggc
61  ggacctgctc tcgcaccgtc cgagcggagc ttctgtttc agtgagccag gtggagcgca
121 gtctacggga gggccactac gtcagcgcgc tgagtcgcac ggcgccggtc tacctcgtc
181 cggttattga gtacctgacg gccaaggtcc cggagctggc gggcaacgag gccagaaca
241 gcggagagcg gaacatcact ccctgctgc tggacatggt ggttcacaac gacaggctac
301 tgagaccctt ttcaacacg accaccatct ctaagtggc ccctggcgag gactagcttc
361 tgacaccggg ccctgggac ctgacaggtc cactcgtcca cccaccggc cccaaatccc
421 ccggcctgaa cccccggcct taaacacct cccccacaa cccaggcccc aaagtcttgg
481 gccttcatta attctgtcaa taaatgttt caaggaa

```

H2AFB2 (Gene ID: 474381)

```

1  agtactggac gcggtactg tcctcttgag agccatctg cctagctggg ccaagccgag
61  atagcacact caacgccag catgccgagg aggaggagac gccgagggtc ctccggtgct
121 ggcggccggg ggcggacctg ctctcgcacc gtccgagcgg agcttctgtt ttactgagc
181 cagggtggagc gcagtctacg ggagggccac tacgctcagc gcctgagtcg cacggcgccc
241 gtctacctcg ctgcggttat tgagtacctg acggccaagg tctggagct ggcgggcaac
301 gaggccaga acagcggaga gcggaacatc actcccctgc tgctggacat ggtggtcac
361 aacgacaggc tactgagcac cctttcaac acgaccacca tctctcaagt ggcccctggc
421 gaggactagc ttctgacacc cggcccctgg gacctgacag gtccactcgt ccaccaccc
481 ggccccaaat cccccggcct gaacccccg cctaaacac cctccccca caaccaggc
541 cccaaagtct tgggcctca ttaattctgt caataaaatg ttcaaggaa gcca

```

H2AFB3 (Gene ID: 83740)

```

1  cgcccagcat gccgaggagg aggagacgcc gagggtcctc cggtgctggc ggccgggggc
61  ggacctgctc tcgcaccgtc cgagcggagc ttctgtttc agtgagccag gtggagcgca
121 gtctacggga gggccactac gtcagcgcgc tgagtcgcac ggcgccggtc tacctcgtc
181 cggttattga gtacctgacg gccaaggtcc tggagctggc gggcaacgag gccagaaca
241 gcggagagcg gaacatcact ccctgctgc tggacatggt ggttcacaac gacaggctac
301 tgagaccctt ttcaacacg accaccatct ctaagtggc ccctggcgag gactagcttc
361 tgacaccggg ccctgggac ctgacaggtc cactcgtcca cccaccggc cccaaatccc
421 ccggcctgaa cccccggcct taaacacct cccccacaa cccaggcccc aaagtcttgg
481 gccttcatta attctgtcaa taaatgttt caaggaa

```

Sequenzierung von H2AFB in verwendeten Vektoren:

H2AFB1 in Vektor PIRES2-ACGFP1xH2AFB3.2

agggtcctccggtgctggcggccggggcgacgtgctctgcaccgtccgagcggagcttctgtttcagtgagccagg
 tggagcgcagctctacgggagggccactacgctcagcgcctgagtcgcacggcgccggtctacctcgtcgcggtattga
 gtacctgacggccaaggtcccggagctggcgggcaacgaggcccagaacagcggagagcggaacatcactcccct
 gctgctggacatggtggtcacaacgacaggctactgagcaccctctcaacacgaccaccatctctcaagtggcccctg
 gcgaggaczagcttctgacacccggcccctgggacctgacaggtccactcgtccaccaccggcccaaatcccc
 ggctgaacccccggccttaaacaccctcccccaacaaccaggcccaaatgcttgggccttcattaattctg

H2AFB3 in Vektor PIRES2-ACGFP1xH2AFB3.3

cgagggctcctccggtgctggcggccggggcgacgtgctctgcaccgtccgagcggagcttctgtttcagtgagcca
 ggtggagcgcagctctacgggagggccactacgctcagcgcctgagtcgcacggcgccggtctacctcgtcgcggtatt
 gtagctgacggccaaggtcctggagctggcgggcaacgaggcccagaacagcggagagcggaacatcactccc
 ctgctgctggacatggtggtcacaacgacaggctactgagcaccctctcaacacgaccaccatctctcaagtggccc
 tggcgaggactagcttctgacacccggcccctgggacctgacaggtccactcgtccaccaccggcccaaatcccc
 cggcctgaacccccggccttaaacaccctcccccaacaaccaggcccaaatgcttgggccttcattaattctg

H2AFB3 in Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB113

cgcccagcatgccgaggaggaggagacgccgagggctcctccggtgctggcggccggggcgacgtgctctgcac
 cgtccgagcggagcttctgtttcagtgagccaggtggagcgcagctctacgggagggccactacgctcagcgcctgag
 cgcacggcgccggtctacctcgtcgcggtattgagtagctgacggccaaggtcctggagctggcgggcaacgaggcc
 cagaacagcggagagcggaacatcactcccctgctgctggacatggt ggtcacaacgacaggctactgagcaccct
 tttcaacacgaccaccatctctcaagtggcccctggcgaggactagcttctgacacccggcccctgggacctgacaggtc
 cactcgtccaccaccggcccaaatccccggcctgaacccccggccttaaacaccctcccccaacaaccaggcc
 ccaaatgcttgggccttcattaattctgtcaataaaatggttcaaggaa

H2AFB2 in Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB211

ccgagatagcacactcaacgccagcatgccgaggaggaggagacgccgagggctcctccggtgctggcggccggg
 ggccgacgtgctctgcaccgtccgagcggagcttctgtttcagtgagccaggtggagcgcagctctacgggagggcca
 ctacgctcagcgcctgagtcgcacggcgccggtctacctcgtcgcggtattgagtagctgacggccaaggtcctggagc
 tggcgggcaacgaggcccagaacagcggagagcggaacatcactcccctgctgctggacatggtggtcacaacga
 caggctactgagcaccctttcaacacgaccaccatctctcaagtggcccctggcgaggac

H2AFB3 in Vektor pAcGFP1-N3xH2AFB321

aaagaatccatgccgaggaggaggagacgccgagggctcctccggtgctggcggccggggcgacgtgctc
 tgcaccgtccgagcggagcttctgtttcagtgagccaggtggagcgcagctctacgggagggccactacgctcagcgc
 ctgagtcgcacggcgccggtctacctcgtcgcggtattgagtagctgacggccaaggtcctggagctggcgggcaacg
 aggcccagaacagcggagagcggaacatcactcccctgctgctggacatggtggtcacaacgacaggctactgagc
 accctttcaacacgaccaccatctctcaagtggcccctggcgaggac

9.2 Aminosäuresequenzen für Proteinvarianten von H2AFB

Aus den Exons der Gene ergeben sich zwei verschiedene Proteine mit einer Aminosäure Unterschied. Aus der Gensequenz H2AFB1 ergibt sich das Protein H2AFB1 und aus der Gensequenz H2AFB2 und 3 das Protein H2AFB2/3. Die ungleiche Aminosäure wurde wieder unterstrichen.

H2AFB1 (bzw. H2ABbd1)

1 mprrrrrrgs sgaggrrtc srtvraelsf vsqverslr eghyaqlsr tapvylaavi
 61 eyltakvpel agneaqnsge rnitpllldm vvhndrllst lfntttisqv apged

H2AFB2/3 (bzw. H2ABbd2/3)

1 mprrrrrrgs sgaggrgrtc srtvraelsf svsqverslr eghyaqlsr tapvylaavi
61 eyltakvlel agneaqnsge rnitpllldm vvhndrllst lfntttisqv apged

9.3 Sequenzierung der Gelelektrophorese von HERV-K-Amplifikaten

Die Sequenzierung der ersten Bande der HERV-K-Gelelektrophorese ergab eine Übereinstimmung mit „Homo sapiens isolate HML-2_3q21.2 endogenous virus HERV-K, complete sequence“ (Sequence ID: JN675023.1) aus der NCBI-Datenbank. Die Banden 2 und 3 ergaben die höchste Übereinstimmung mit „Homo sapiens endogenous virus HERV-K clone 11A11.Lm08 nonfunctional envelope protein mRNA, complete sequence“ (Sequence ID: KF254385.1). Wobei die zweite Bande entsprechend zusätzlich nicht codierende Sequenz besitzt. Die Intensität der zweiten Bande hatte bei H2AFB-transgenen L428 abgenommen.

Sequenzierung HERV-K Bande 1

tattcgtccgcttctgtgataagtgaaatctactgatgggacagacagtaggtacttctaccaaccaatttggactggaggc
aataaacatcctggctctccctaggcaaataggaggataacgatacccaatggaaatatttatcatcatcccttctctc
aggttggcagggcagcgatcatctgtggggccaggtaccatacactatcattaacatatacttctataggattatccatcc
atgtgactgcccgaattaagggcgggaaaggcacttaggctagtaggtataattagctgcagctgtcctacaggcatg
gggagactaccaccattgatattttatcaaaggtgtattttcatactctctggagttgtgtcacctttgttctcaaggcct
ttgtagctaactgtgtcagcttctttttttgccccaatcggcggctctgcccttctgggtgggatgggcaacttcatctttt
cttctgactcccccttttggttgtcgaggtgattcaagcgggtgttgcattgtgggtctccgtctccacgtgctgttttcttgca
tcccggatgattcattgacttaactgaaatgtctagtgggaatccaagacagctgattttattctgtcgaggcgaaacaca
aagca

Sequenzierung HERV-K Bande 2

acttctgtttggaaccactagacatttgaagttctacaatgaaccatcggagatgcaaagaaaagggcctccacgga
gacgaaacaccactcacatggatggataatcctatagaagtataatgtaatgatagtgatgggtacctggccccacag
atgatcgggtccctgcccacctgaggaagaagggatgatgataaatattccattgggtatcgttatcctcctattgccta
gggagagcaccaggatgttaatgctgcagtcacaaaattggttggtgaagtacctactgtcagctcctaacagtagattca
cttatcacatggaagcgggatgtcactcaggccacgggtcaattattaattcgggcagatggatggatggataatcctata
gaaatataatgtaatgatagtgatgctacctggccccatgaatgatggctgccctgcccacctgagaaagaaaggat
gatgataaatattcccattgggtatgcctccctcctatttgctaggacaagcacctggatgatgaatgcctgccatccatg
attggtgaaggactacctactgtcccaccatcgattcatttattgcatggaagcgggatgtcactcaggccacggg
ttaactaaggcc

Sequenzierung HERV-K Bande 3

ccttctgtttggaaccactagacatttgaagttctacaatgaaccatcggagatgcaaagaaaagggcctccacgga
gatggtaaccccagtcacatggatggataatcctatagaagtataatgtaatgatagtgatgggtacctggccccacagat
gatcgtgccctgcccacctgaggaagaagggatgatgataaatattccattgggtatcgttatcctcctatttgcttagg
gagagcaccaggatgttaatgctgcagtcacaaaattggttgtagaagtacctactgtcagctcctaacagtagattcact
tatcacatggaagcgggatgtcactcaggccacgggaaaattaa

9.4 Korrelation von HERV und H2AFB: Punktdiagramme für HERV-F und -W**9.4.1 HERV-F und H2AFB**

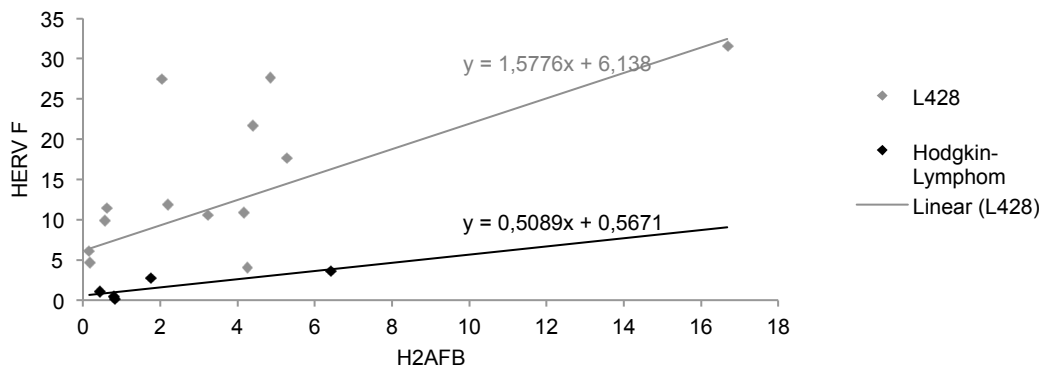


Abbildung 33: HERV-F und H2AFB in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen
 Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-F und unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zellen (grau) und H2AFB- und Leervektor-transgenen L428-Zellen. Die Auswertung erfolgte entsprechend zu HERV-K.

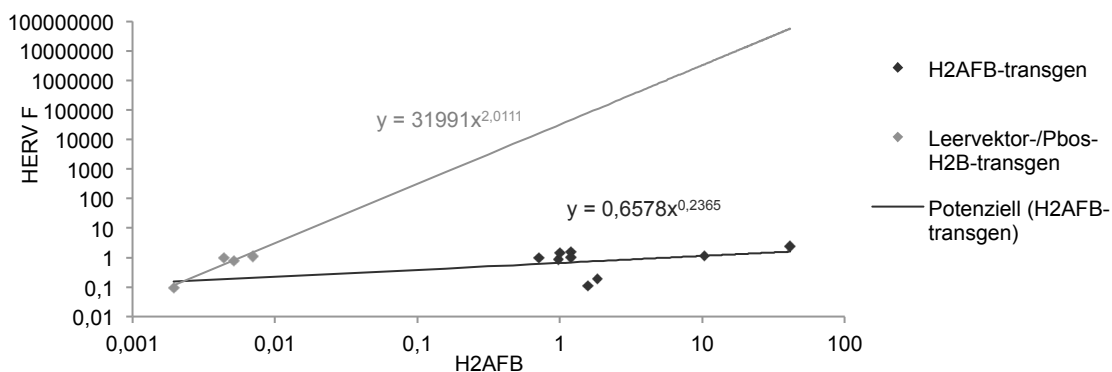


Abbildung 34: HERV-F und H2AFB in transgenen A673-Zellen
 Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-F und Leervektor- bzw. H2B-transgenen A673 (grau) und H2AFB-transgenen A673-Zellen. Die Auswertung erfolgte entsprechend zu HERV-K.

9.4.2 HERV-W und H2AFB

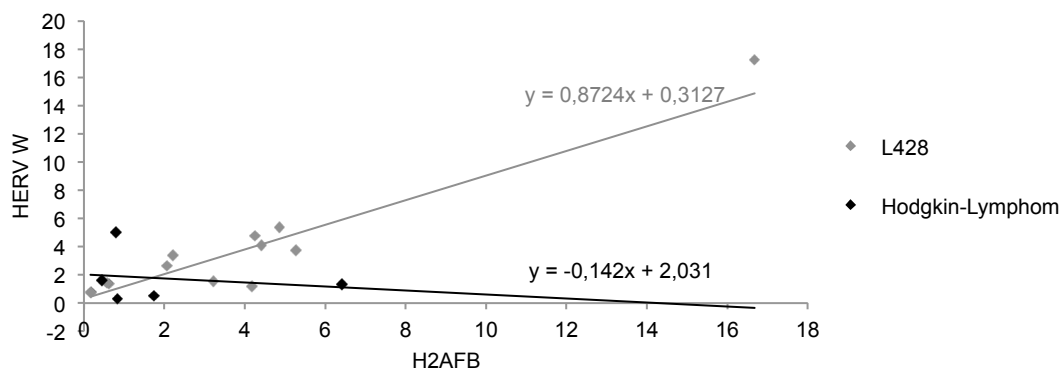


Abbildung 35: HERV-W und H2AFB in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen
 Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-W und unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zellen (grau) und H2AFB- und Leervektor-transgenen L428-Zellen. Die Auswertung erfolgte entsprechend zu HERV-K.

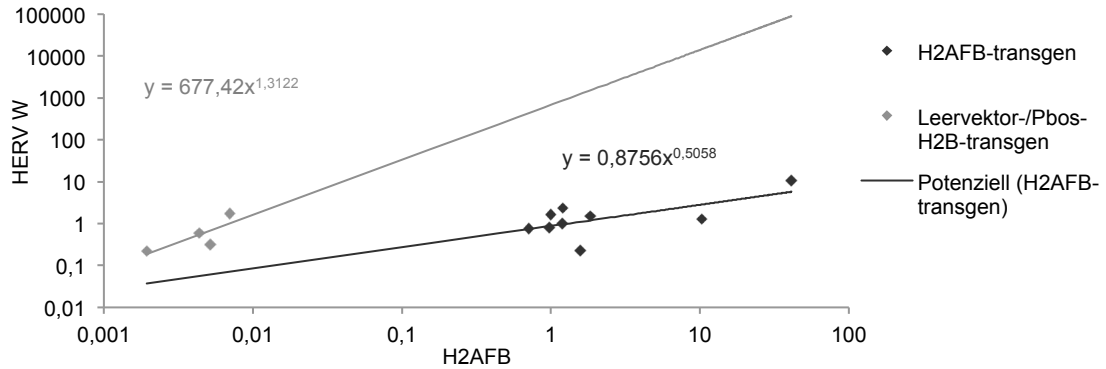


Abbildung 36: HERV-W und H2AFB in transgenen A673-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-F und Leervektor- bzw. H2B-transgenen A673 (grau) und H2AFB-transgenen A673-Zellen. Die Auswertung erfolgte entsprechend zu HERV-K.

9.4.3 HERV-K und HERV-F

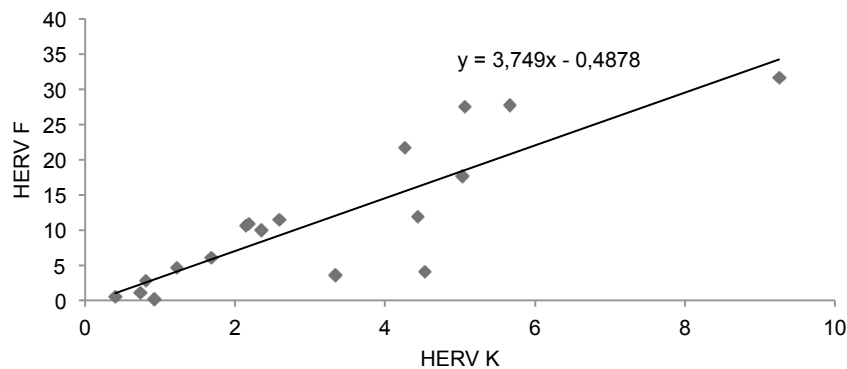


Abbildung 37: HERV-K und -F in HL-Zelllinien und transgenen L428-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-K und HERV-F in unbehandelten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien HDLM2, KMH2, L540, L428 und L1236 und Leervektor- und H2AFB-transgenen L428-Zellen.

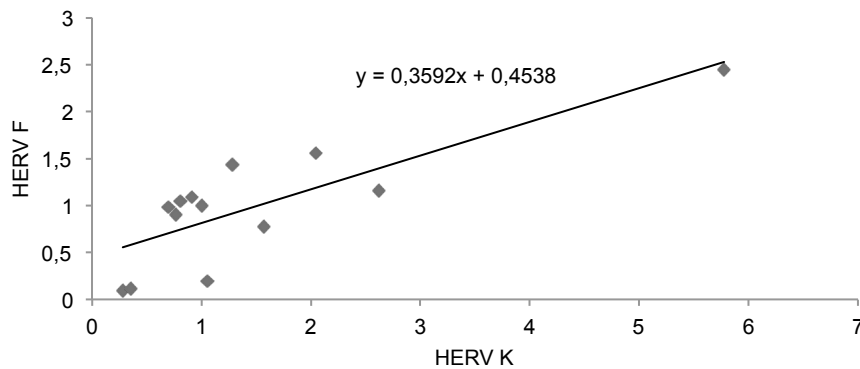


Abbildung 38: HERV-K und F in transgenen A673-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen HERV-K und HERV-F in Leervektor- und H2AFB-transgenen A673-Zellen.

9.5 Daten der *heat-map*

Zu sehen sind die Daten für die im Ergebnisteil dargestellte *heat-map*. Sie stammen aus den *Probesets* der Exon-Analyse. Angegeben sind *Probeset-ID* in Reihenfolge der *heat-map*.

JUC03004790.hg.1, PSR03009577.hg.1, PSR01011605.hg.1, PSR01011608.hg.1,
 JUC03004794.hg.1, JUC03004786.hg.1, JUC02008181.hg.1, PSR03009576.hg.1,
 JUC02008195.hg.1, JUC12010377.hg.1, PSR01011597.hg.1, JUC01006008.hg.1,
 JUC02008200.hg.1, JUC03016726.hg.1, JUC12011429.hg.1, JUC01029123.hg.1,
 JUC0X000864.hg.1, PSR01011601.hg.1, JUC19010209.hg.1, JUC06000733.hg.1,
 PSR01011598.hg.1, PSR10023337.hg.1, PSR03033643.hg.1, JUC09011459.hg.1,
 PSR02015363.hg.1, PSR01011594.hg.1, JUC19003459.hg.1, JUC01022197.hg.1,
 JUC02008202.hg.1, PSR02015354.hg.1, JUC05010885.hg.1, PSR03009580.hg.1,
 JUC22002387.hg.1, JUC03000598.hg.1, PSR17017284.hg.1, JUC10010259.hg.1,
 PSR02015355.hg.1, PSR10017598.hg.1, PSR02015366.hg.1, JUC0X000868.hg.1,
 PSR10023338.hg.1, JUC05014912.hg.1, JUC03016732.hg.1, PSR10009689.hg.1,
 PSR01011599.hg.1, JUC12010863.hg.1, JUC10010256.hg.1, JUC08006957.hg.1,
 JUC02005946.hg.1, JUC10010267.hg.1, PSR04017716.hg.1, PSR10017611.hg.1,
 PSR02015357.hg.1, JUC0X000865.hg.1, JUC02022373.hg.1, JUC15000353.hg.1,
 JUC03008181.hg.1, JUC10002481.hg.1, JUC08002829.hg.1, JUC03016734.hg.1,
 JUC10005399.hg.1, JUC12000652.hg.1, JUC06013394.hg.1, JUC0X000871.hg.1,
 JUC10010264.hg.1, JUC02014765.hg.1, JUC12000428.hg.1, JUC19013819.hg.1,
 JUC12012907.hg.1, JUC12006259.hg.1, JUC20005181.hg.1, JUC12000643.hg.1,
 JUC03004395.hg.1, JUC11019384.hg.1, JUC02017500.hg.1, JUC02017503.hg.1,
 JUC02017506.hg.1, PSR08002850.hg.1, JUC03016749.hg.1, JUC03016742.hg.1,
 PSR03033657.hg.1, PSR03033647.hg.1, PSR0X001588.hg.1, JUC0X000870.hg.1,
 JUC09003991.hg.1, JUC06004936.hg.1, JUC01006016.hg.1, PSR12017851.hg.1,
 JUC17005750.hg.1, JUC02023158.hg.1, JUC04000413.hg.1, PSR02015356.hg.1,
 JUC01032027.hg.1, JUC04007034.hg.1, PSR17017287.hg.1, JUC10010263.hg.1,
 PSR03033664.hg.1, JUC05012639.hg.1, JUC01017874.hg.1, PSR03033635.hg.1,
 JUC10013476.hg.1, JUC04008260.hg.1, JUC08011385.hg.1, JUC03003980.hg.1,
 PSR01011593.hg.1, JUC10006467.hg.1, PSR01011596.hg.1, JUC10010260.hg.1,
 JUC04010495.hg.1, PSR03018220.hg.1, JUC05001228.hg.1, PSR03033658.hg.1,
 JUC10008155.hg.1, JUC12010875.hg.1, JUC17002157.hg.1, PSR03033652.hg.1,
 PSR03033655.hg.1, JUC21001588.hg.1, JUC09004233.hg.1, JUC14007659.hg.1,
 PSR19013032.hg.1, JUC16008181.hg.1, JUC03015854.hg.1, JUC03016733.hg.1,
 JUC01016790.hg.1, JUC19017421.hg.1, JUC12003043.hg.1, PSR02015351.hg.1,
 PSR03033646.hg.1, JUC03016748.hg.1, PSR22002812.hg.1, PSR06014781.hg.1,
 PSR03033653.hg.1, JUC01014052.hg.1, JUC10010249.hg.1, JUC02033263.hg.1,
 JUC14000689.hg.1, PSR08020741.hg.1, JUC05019757.hg.1, JUC01031457.hg.1,
 JUC07020483.hg.1, JUC13004843.hg.1, JUC13003607.hg.1, JUC09003675.hg.1,
 JUC10005471.hg.1, JUC05019751.hg.1, JUC16009748.hg.1, PSR22004393.hg.1,
 JUC14007277.hg.1, JUC19012619.hg.1, PSR0X020836.hg.1, PSR0X010602.hg.1,
 PSR0X010695.hg.1

9.6 Microarray-Daten

Die zur Validierung des *Microarrays* verwendeten Gene wurden in der qRT-PCR mit RNA aus weiteren Proben untersucht. Außerdem wurden sie mit Daten aus einer *Microarray*-Datenbank (verschiedene Gewebe und Zellen) verglichen. Die Daten stammen aus: GSE7307, GSE3526, GSE12453, GSE14879, GSE12427, GSE20011, GSE25986, GSE25990, GSE7234, GSE8596, GSE19197.

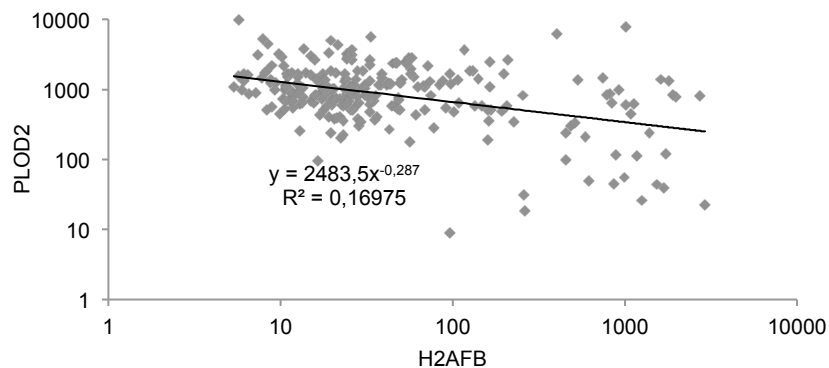


Abbildung 39: Microarray-Datenbank zu PLOD2 und H2AFB

Dargestellt sind *Microarray*-Daten aus einer *Gene Expression Omnibus* (GEO)-Datenbank. Für PLOD2 wurde der Mittelwert aus 2 *Probesets* gebildet. Es wurde eine Trendlinie erstellt, welche einen R^2 von 0,16975 ergab.

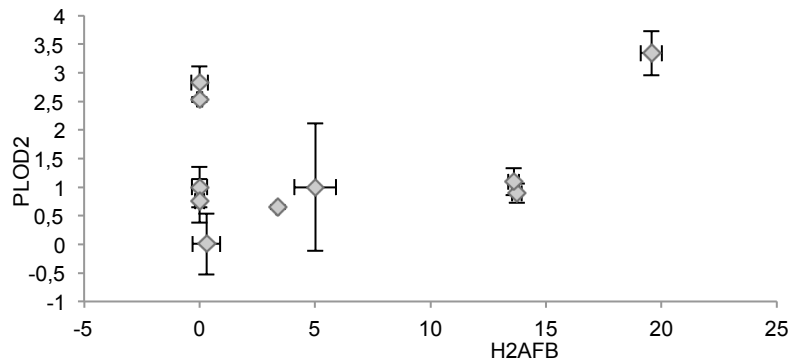


Abbildung 40: PLOD2 und H2AFB in transgenen A673-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen PLOD2 und H2AFB in H2AFB- und Leervektor-transgenen A673. Die Daten wurden in einer Zweifach-Bestimmung in der qRT-PCR erhoben und nach dem gleichen Prinzip ausgewertet wie die Punktdiagramme aus dem Ergebnisteil.

In den Daten aus der *Microarray*-Datenbank ist ein Trend zur negativen Korrelation zwischen PLOD2 und H2AFB zu erkennen. Dieser ließ sich in den untersuchten transgenen A673-Zellen nicht bestätigen.

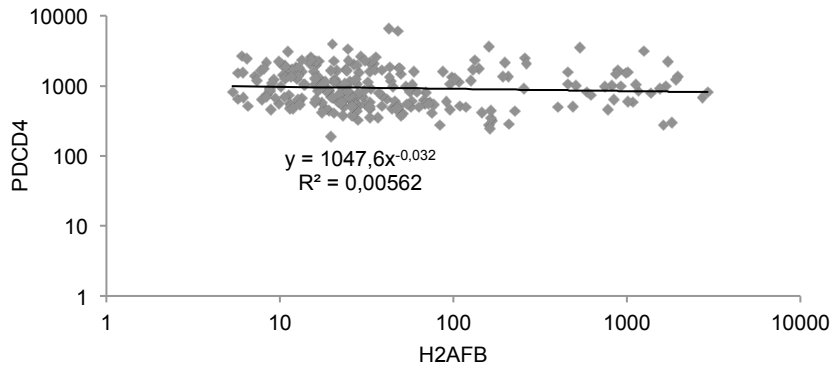


Abbildung 41: Microarray-Datenbank zu PDCD4 und H2AFB

Dargestellt sind *Microarray*-Daten aus einer *Gene Expression Omnibus* (GEO)-Datenbank. Für PDCD4 wurde der Mittelwert aus 5 *Probesets* gebildet. Die Trendlinie zeigt einen R^2 von 0,00562.

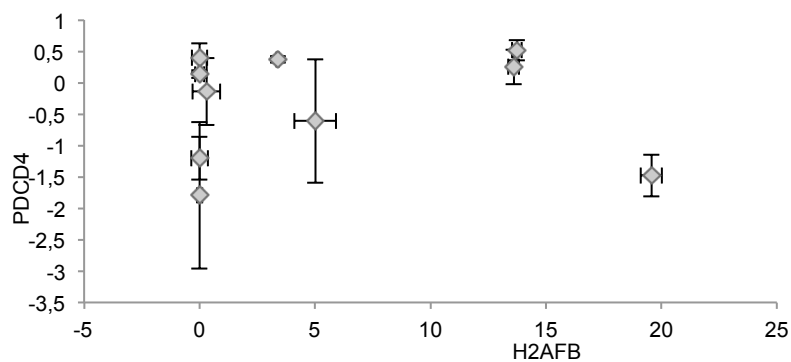


Abbildung 42: PDCD4 und H2AFB in transgenen A673-Zellen

Dargestellt ist die Korrelation zwischen PDCD4 und H2AFB in H2AFB- und Leervektor-transgenen A673. Die Daten wurden in einer Zweifach-Bestimmung in der qRT-PCR erhoben und nach dem gleichen Prinzip ausgewertet wie die Punktdiagramme aus dem Ergebnisteil.

In der Microarray-Datenbank-Analyse zeigte sich nur ein sehr geringer negativer Trend für die Korrelation zwischen PDCD4 und H2AFB. Auch in den untersuchten transgenen A673 zeigte sich keine aussagekräftige Korrelation.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Darmstadt, den 24.06.2020

Lea Isabel Ohm

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Darmstadt, den 24.06.2020

Lea Isabel Ohm

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Darmstadt, den 24.06.2020

Lea Isabel Ohm

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Lea Isabel Ohm
 Geburtsdaten: 11.07.1993 in Arolsen
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Laufbahn:

07/2019 **Klinikum Darmstadt**
Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
 Anstellung als Assistenzärztin

07/2019 Approbation

Akademische Ausbildung:

05/2018 – 05/2019 **Goethe-Universität Frankfurt**
 Studium der Humanmedizin
 3. Staatsexamen 05/2019

10/2012 – 05/2018 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 Studium der Humanmedizin
 2. Staatsexamen 04/2018
 1. Staatsexamen 09/2014

Praktisches Jahr

05/2018-09/2018 Klinikum Darmstadt
 Medizinische Klinik III – Nieren-, Hochdruck-,
 Rheumaerkrankungen
 Medizinische Klinik I – Kardiologie

09/2018-12/2018 Klinikum Darmstadt
 Klinik für Unfallchirurgie
 Klinik für Viszeralchirurgie
 Klinik für Urologie

01/2019-04/2019 Klinikum Darmstadt
 Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde

Promotion:

Untersuchung zur Funktion der Histonvariante
 H2AFB in Tumorzellen

08/2016 – 07/2017 Praktische Arbeit im Forschungslabor der Kinder-
 und Jugendklinik Universitätsklinikum Halle-
 Wittenberg, apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic.
 habil. Martin S. Staeger

Schulische Ausbildung

2003 – 2012 Gymnasium Christian-Rauch-Schule, Bad
Arolsen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1999 – 2003 Grundschule Villa R, Volkmarsen

Soziales Engagement

08/2016 – 08/2017 Frankesche Stiftungen Halle
Stammtisch Sprache

Darmstadt, den 24.06.2020

Lea Isabel Ohm

Veröffentlichungen

Konferenzbeiträge/Poster-Vorstellungen:

Ohm LI. Untersuchung zur Funktion der Histonvariante H2AFB in Tumorzellen. Doktoranden-Kongress der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2017).

Ohm LI, Staeger MS. Gene expression in correlation to the cancer/testis antigen histone H2A family member B (H2AFB). 5th European Congress of Immunology, 02.09.-05.09.2018, Amsterdam, Niederlande (2018).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikum Halle für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit, sowie für Unterstützung, Rat und Anregungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Desweiteren danke ich Frau Ines Volkmer aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin für die tolle und intensive Betreuung meiner praktischen Arbeit im Labor.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wienke vom Institut für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik für die freundliche Beratung bei statistischen Fragestellungen.

Im Besonderen danke ich auch meinen Freunden und meiner Familie, meinen Eltern Christiane und Heinz-Dieter und meinem Freund Oliver, die mich stets unterstützt haben.