

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik 2 (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie,  
Rheumatologie, Infektiologie)  
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Untersuchung der Rolle von BRD7 und DOT1L  
im Prä-B-Zellrezeptor-Signalweg**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Jessica Lena Peter

aus Limburg an der Lahn

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Thomas Oellerich
Korreferent/in:	Prof. Dr. Evelyn Ullrich
Tag der mündlichen Prüfung:	07.03.2023

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	12
Abkürzungsverzeichnis .....	13
Verwendete Einheiten .....	18
1 Einleitung .....	19
1.1 B-Lymphozyten.....	19
1.1.1 Reifung der B-Zellen und Antikörperentwicklung.....	21
1.1.2 Der B-Zellrezeptor (BZR).....	24
1.1.3 Prä-B-Zellen .....	26
1.1.3.1 Signalwirkung in Prä-B-Zellen.....	26
1.1.3.2 Bedeutung der Signalwege <i>downstream</i> des Prä-BZRs .....	27
1.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL) .....	31
1.2.1 Klassifikationen .....	32
1.2.1.1 FAB-Klassifikation .....	32
1.2.1.2 WHO-Klassifikation .....	33
1.2.2 Genetische Modifikationen .....	33
1.2.3 Diagnostik.....	34
1.2.4 Therapie .....	35
1.2.5 Prä-B-Zell-ALL.....	39
1.3 RCH-ACV .....	39
1.4 Untersuchung von Proteinen <i>downstream</i> im BZR-Signalweg .....	41
1.4.1 DOT1L.....	43
1.4.2 BRD7.....	45
2 Zielsetzung.....	50
3 Material und Methoden .....	52

3.1	Material.....	52
3.1.1	Geräte .....	52
3.1.2	Allgemeine Labormaterialien .....	54
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	55
3.1.3.1	Restriktionsenzyme und -puffer .....	57
3.1.4	Puffer und Gelmedien .....	58
3.1.5	Antikörper .....	59
3.1.5.1	Primäre Antikörper für den Western Blot.....	59
3.1.5.2	Sekundäre Antikörper für den Western Blot.....	60
3.1.5.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	61
3.1.5.4	Antikörper für die Immunpräzipitation.....	61
3.1.5.5	Sonstige Antikörper.....	61
3.1.6	Inhibitoren.....	62
3.1.7	Oligonukleotide.....	62
3.1.7.1	Plasmide .....	62
3.1.7.2	shRNAs.....	65
3.1.7.3	Primer .....	66
3.1.7.4	Linker-Peptide .....	68
3.1.8	Verwendete Zelllinien .....	68
3.1.8.1	Humane Zelllinien .....	68
3.1.8.2	Bakterielle Zellen .....	69
3.1.9	Zellkulturmedien und -zusätze.....	69
3.1.9.1	Zusammensetzung verschiedener Medien .....	70
3.1.10	Kommerzielle Kits.....	71
3.1.11	Software .....	71
3.2	Methoden.....	73
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	73

3.2.1.1	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	73
3.2.1.2	Kultivierung der Zelllinien .....	73
3.2.1.3	Zellzählung.....	74
3.2.1.4	Stimulation des Prä-BZRs mit $\alpha$ -IgM und Behandlung der Zellen mit PI3K-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren .....	75
3.2.1.5	Behandlung der RCH-ACV mit DOT1L-Inhibitoren .....	76
3.2.1.6	Durchflusszytometrie.....	77
3.2.1.7	Virale Transduktion .....	80
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	84
3.2.2.1	Lysieren von Zellen .....	84
3.2.2.2	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode .....	84
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	85
3.2.2.4	Western Blot .....	85
3.2.2.5	Fraktionierung .....	88
3.2.2.6	Immunopräzipitation (IP).....	88
3.2.3	DNA-Techniken .....	90
3.2.3.1	Klonierung eines induzierbaren BRD7-Überexpressionsvektors.....	90
3.2.3.2	Klonierung eines GECIR-Leervektors .....	98
3.2.3.3	Retransformation eines konstitutiv aktiven BRD7-Überexpressionsvektors.....	98
3.2.3.4	Klonierung von Vektoren mit BRD7-Knockdown.....	98
3.2.4	RNA-Techniken .....	101
3.2.4.1	RNA-Extraktion .....	101
3.2.4.2	DNase-Verdau .....	101
3.2.4.3	cDNA-Synthese .....	102
3.2.4.4	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) .....	103
3.2.5	Massenspektrometrie: Globales Proteom.....	105

4	Ergebnisse .....	111
4.1	Charakterisierung der RCH-ACV .....	111
4.1.1	Effekte der PI3K-Inhibition.....	111
4.1.1.1	PI3K-Inhibition vermindert die Phosphorylierung von AKT....	111
4.1.1.2	RCH-ACV reagieren sensitiv auf PI3K-Inhibition. ....	112
4.1.2	Effekte der MEK-Inhibition.....	114
4.1.2.1	MEK-Inhibition vermindert die Phosphorylierung von ERK. ...	114
4.1.2.2	RCH-ACV sind nicht abhängig vom MEK-Signalweg.....	115
4.1.2.3	A375 sind vom MEK-Signalweg abhängig. ....	116
4.2	DOT1L-Inhibition bei RCH-ACV.....	118
4.2.1	DOT1L-Inhibition verringert die Methylierung von H3K79. ....	118
4.2.2	RCH-ACV zeigen keine Abhängigkeit von DOT1L.....	119
4.3	BRD7-Expression in unterschiedlichen Zelllinien .....	122
4.4	Induzierbare BRD7-Überexpression .....	123
4.4.1	Klonierung der induzierbaren BRD7-Überexpression.....	123
4.4.2	Zusammenhang BRD7-Überexpression und GFP-Expression....	123
4.4.3	pAKT und pERK sinken erst nach 14 Tagen. ....	125
4.4.4	BRD7-überexprimierende Zellen zeigen einen Wachstumsnachteil im Wettbewerbsassay.....	128
4.4.5	Von induzierbarem Vektor kodiertes, überexprimiertes BRD7 ist im Nucleus und im Cytoplasma lokalisiert.....	130
4.5	Konstitutive BRD7-Überexpression (MSCV N-term HA-Flag puro BRD7).....	131
4.5.1	Untersuchungen mit Stimulation der BRD7- Überexpressionszellen .....	134
4.5.1.1	Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Stimulationszeiten .....	135

4.5.1.2	BRD7-Überexpression führt zur Abnahme der Phosphorylierung von AKT. ....	136
4.5.1.3	BRD7-Überexpression führt zur Abnahme der Phosphorylierung von ERK. ....	138
4.5.2	BRD7-überexprimierende Zellen reagieren weniger sensitiv auf PI3K-Inhibition. ....	139
4.5.3	Immunopräzipitation .....	141
4.5.4	Überexprimiertes BRD7 befindet sich im Nukleus. ....	144
4.5.5	Ansatzpunkt der BRD7-Überexpression.....	144
4.5.6	Massenspektrometrische Untersuchung: globales Proteom .....	146
4.6	BRD7-Knockdown .....	149
4.6.1	Klonierung der Vektoren, die für den Knockdown von BRD7 kodieren.....	150
4.6.2	BRD7-Knockdown führt zu verminderter Zell-Proliferation .....	150
4.6.3	Untersuchungen mit Stimulation der Knockdownzellen.....	152
4.6.3.1	BRD7-Knockdown führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT. ....	152
4.6.3.2	BRD7-Knockdown führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK. ....	153
4.7	Fazit des Ergebnisteils.....	154
5	Diskussion.....	156
5.1	Prä-BZR als therapeutischer Ansatzpunkt bei ALL.....	157
5.2	Nicht-MLL-rekombinierte Zellen zeigen keine Abhängigkeit von DOT1L. ....	160
5.3	BRD7 zeigt einen Tumorsuppressor-Phänotyp in RCH-ACV. ....	161
5.4	Hypothetische Prä-BZR/BRD7-Feedback-Schleife.....	162
5.4.1	Untersuchung der BRD7-Phosphosite mittels Phosphomimetikum .....	163
5.5	Schwellenwert für die Toxizität von BRD7 .....	165

5.5.1	<i>Transcription factor 3 (TCF3)</i> weist ebenfalls einen Schwellenwert für die Toxizität auf .....	165
5.5.2	Proapoptotische Wirkungen der Signalwege des Prä-BZR .....	167
5.5.2.1	Pro- und antiapoptotische Wirkung einer Überaktivierung von ERK.....	167
5.5.2.2	Proapoptotische Wirkung einer Überaktivierung von AKT ....	169
5.5.2.3	Proapoptotische Wirkung einer Überaktivierung der Prä-BZR-proximalen Kinasen SYK und BTK .....	169
5.5.3	Klonierung eines Knockouts mittels CRISPR/Cas9.....	170
5.6	Untersuchung der Regulation von Prä-BZR-proximalen Kinasen .....	172
5.6.1	Detektion von Interaktionen zwischen BRD7 und DNA-Abschnitten mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	172
5.7	Einfluss von BRD7 auf die Energiegewinnung von Tumorzellen .....	173
5.8	BRD7 fördert Zellerkennung und -assoziation. ....	176
5.9	Lokalisation von BRD7 .....	177
5.10	Charakterisierung der Prä-B-Zellen RCH-ACV .....	178
5.11	BRD7 als therapeutischer Ansatzpunkt bei der Prä-B-Zell-ALL .....	180
6	Zusammenfassung.....	184
7	Abstract.....	186
	Literaturverzeichnis .....	188

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung der Zellen des Immunsystems.....	19
Abbildung 2: Entwicklung von B-Zellen in unterschiedlichen Organen.....	21
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der VD(J)-Rekombination in der schweren Kette der Immunglobuline .....	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prä-BZRs .....	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des BZRs .....	25
Abbildung 6: Signalwege des Prä-BZRs und beteiligte Proteine .....	28
Abbildung 7: Ausstrich von Knochenmarksblut von einem Patienten mit ALL..	35
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Risikoabschätzung und Therapie bei ALL.....	36
Abbildung 9: Karyogramm bei RCH-ACV .....	40
Abbildung 10: Charakterisierung der RCH-ACV-Zellen.....	41
Abbildung 11: Strukturformel des SYK-Inhibitors PRT062607 .....	42
Abbildung 12: Immunologische Darstellung von pAKT nach SYK-Inhibition ....	42
Abbildung 13: Globales Phosphoproteom (gPome) von RCH-ACV nach 1 h SYK-Inhibition .....	43
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktion von DOT1L.....	44
Abbildung 15: Darstellung der IC <sub>50</sub> -Werte verschiedener Zelllinien, die 14 Tage mit dem DOT1L-Inhibitor EPZ5676 behandelt wurden.....	44
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionen von DOT1L.....	45
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Funktion von BRD7.....	46
Abbildung 18: BRD7 blockiert den Übergang von der G1- in die S-Phase.....	47
Abbildung 19: Einige Interaktionspartner von BRD7 .....	48
Abbildung 20: Schematische Darstellung der für die Klonierung bedeutsamen Bestandteile des verwendeten GECIR-Vektors .....	63
Abbildung 21: Schematische Darstellung der für die Klonierung bedeutsamen Bestandteile des verwendeten GEPIR-Vektors .....	64
Abbildung 22: Darstellung der Bestandteile des Vektors MSCV N-term HA- FLAG puro BRD7 .....	64
Abbildung 23: Aufbau einer Western Blot Apparatur .....	86
Abbildung 24: Schematische Darstellung des Vorgehens bei Durchführung eines Western Blots .....	87
Abbildung 25: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der IP.....	89
Abbildung 26: Darstellung der Bestandteile des induzierbaren BRD7- Überexpressions-Vektors sowie der Schnittstellen für Restriktionsenzyme.....	95
Abbildung 27: Schematische Darstellung einer massenspektrometrischen Analyse .....	106
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Prozesse bei der ESI .....	107
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Vorgehens zur massenspektrometrischen Analyse des globalen Proteoms der BRD7- Überexpressionszellen im Vergleich zu Kontrollzellen .....	109
Abbildung 30: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) bei PI3K- Inhibition bei RCH-ACV.....	112
Abbildung 31: Überlebenskurve der RCH-ACV ( <i>schwarz</i> ), SMS-SB ( <i>rot</i> ) und Daudi ( <i>blau</i> ) nach PI3K-Inhibition.....	113
Abbildung 32: Immunologische Darstellung von pERK (Thr202/Tyr204) nach MEK-Inhibition bei RCH-ACV .....	115

Abbildung 33: Überlebenskurven der RCH-ACV nach MEK-Inhibition .....	116
Abbildung 34: Immunologische Darstellung von pERK bei MEK-Inhibition bei A375 .....	117
Abbildung 35: Überlebenskurve der A375 nach MEK-Inhibition .....	117
Abbildung 36: Immunologische Detektion von H3K79 nach DOT1L-Inhibitor bei RCH-ACV .....	118
Abbildung 37: Apoptose-Assay der RCH-ACV nach DOT1L-Inhibition .....	119
Abbildung 38: Apoptose-Assay der MV4-11 nach DOT1L-Inhibition .....	120
Abbildung 39: Wachstumsverhalten der RCH-ACV (a) und MV4-11 (b) unter DOT1L-Inhibition .....	121
Abbildung 40: Immunologische Darstellung von BRD7 in verschiedenen Zelllinien .....	122
Abbildung 41: Prozentsatz der GFP-positiven RCH-ACV-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Doxycyclin- Konzentrationen .....	123
Abbildung 42: Korrelation GFP-Expression und BRD7-Überexpression bei RCH-ACV .....	124
Abbildung 43: Immunologische Detektion von pAKT (Ser473) und pERK (Thr202/Tyr204) bei BRD7-Überexpression nach 48 Stunden .....	125
Abbildung 44: Kompetitionsassay mit unsortierten BRD7- Überexpressionszellen (BRD7_ov) .....	126
Abbildung 45: Immunologische Detektion von pAKT und pERK bei induzierbarer BRD7-Überexpression nach 14 Tagen .....	128
Abbildung 46: Schematische Darstellung des Vorgehens bei diesem Kompetitionsassay .....	129
Abbildung 47: Kompetitionsassay mit den induzierten BRD7- Überexpressionszellen .....	130
Abbildung 48: Immunologische Darstellung der Lokalisation von BRD7 bei der induzierbaren BRD7-Überexpression .....	131
Abbildung 49: Immunologische Darstellung der konstitutiv BRD7- überexprimierenden RCH-ACV-Zellen (BRD7_ov) im Vergleich zu den Kontrollzellen .....	132
Abbildung 50: BRD7-mRNA-Expression in den BRD7- Überexpressionszellen und in den Kontrollzellen .....	134
Abbildung 51: Immunologische Darstellung einiger Effektoren nach unterschiedlichen Stimulationszeiten .....	136
Abbildung 52: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) bei RCH- ACV-Zellen mit konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression .....	137
Abbildung 53: Immunologische Darstellung von pERK (Thr202/Tyr204) bei den RCH-ACV-Zellen mit konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen .....	138
Abbildung 54: Überlebenskurven der BRD7-Überexpressionszellen und der RCH-ACV-Kontrollzellen nach PI3K-Inhibition .....	139
Abbildung 55: Fluoreszenzdarstellung der viablen und apoptotischen RCH- ACV-Kontroll- und BRD7-Überexpressionszellen nach PI3K-Inhibition ..	141
Abbildung 56: Immunologische Darstellung zweier Antikörper, die gegen Isoformen von p85 gerichtet sind (in RCH-ACV) .....	142
Abbildung 57: Immunologische Darstellung der Immunopräzipitation mit dem p85-Antikörper .....	143

Abbildung 58: Immunologische Darstellung der Lokalisation von BRD7 bei konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression in RCH-ACV .....	144
Abbildung 59: Immunologische Darstellung von BTK und SYK bei RCH-ACV mit BRD7-Überexpression .....	145
Abbildung 60: Säulendiagramm der Anreicherungsanalyse des globalen Proteoms der RCH-ACV-Zellen mit BRD7-Überexpression unter Abgleich mit der Datenbank GOCC .....	147
Abbildung 61: Darstellung der regulierten Proteine in RCH-ACV mit BRD7-Überexpression unter Abgleich mit der Datenbank GOCC .....	148
Abbildung 62: Immunologische Detektion von BRD7 in RCH-ACV mit BRD7-Knockdown .....	150
Abbildung 63: Kompetitionsassay mit den shBRD7-Sequenzen 1 und 2 sowie den RCH-ACV-Kontrollzellen .....	151
Abbildung 64: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) in RCH-ACV nach BRD7-Knockdown .....	153
Abbildung 65: Immunologische Darstellung von pERK in RCH-ACV nach BRD7-Knockdown .....	154
Abbildung 66: Schematische Darstellung der hypothetischen Feedback-Schleife bei Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs .....	163
Abbildung 67: Phosphomimetik von Phosphoserin und Asparaginsäure .....	164
Abbildung 68: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Prinzips .....	171
Abbildung 69: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	173
Abbildung 70: Schematische Darstellung der bei der Atmungskette ablaufenden Prozesse .....	174

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Dissertationsarbeit verwendete Einheiten .....	18
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der B-Zell-Leukämien und Lymphome anhand genetischer Anomalien .....	33
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	54
Tabelle 4: Allgemeine Labormaterialien .....	55
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	57
Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme und -puffer .....	58
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Gelmedien.....	59
Tabelle 8: Primäre Antikörper für den Western Blot .....	60
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für den Western Blot .....	61
Tabelle 10: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	61
Tabelle 11: Antikörper für die Immunpräzipitation .....	61
Tabelle 12: Sonstige Antikörper .....	61
Tabelle 13: Verwendete Inhibitoren.....	62
Tabelle 14: Verwendete Plasmide.....	62
Tabelle 15: shRNAs zur Klonierung eines Knockdowns von BRD7 .....	65
Tabelle 16: Unspezifische shRNAs als Kontrollsequenzen .....	66
Tabelle 17: Primer für die Klonierung eines Vektors für die induzierbare BRD7-Überexpression .....	67
Tabelle 18: Primer für die Klonierung der Vektoren mit BRD7-Knockdown.....	67
Tabelle 19: Primer für die qPCR zur Bestätigung und Quantifizierung der BRD7-Überexpression .....	67
Tabelle 20: Verwendete Sequenzierprimer .....	68
Tabelle 21: Verwendete Linker-Peptide .....	68
Tabelle 22: Verwendete humane Zelllinien .....	69
Tabelle 23: Verwendete bakterielle Zellen .....	69
Tabelle 24: Verwendete Zellkulturmedien .....	69
Tabelle 25: Verwendete Zellkulturmedienzusätze .....	70
Tabelle 26: Zusammensetzung verschiedener Medien .....	71
Tabelle 27: Verwendete kommerzielle Kits .....	71
Tabelle 28: Verwendete Software .....	72
Tabelle 29: Plasmide für Retrovirus-Produktion .....	82
Tabelle 30: Plasmide für Lentivirus-Produktion .....	83
Tabelle 31: Pipettierschema für den qPCR-Ansatz in einer 48-Well-Platte ....	104
Tabelle 32: Detektierte Schwellenwerte bei der qPCR in Abhängigkeit von den verwendeten Zellen und Primern .....	133
Tabelle 33: Errechnete Mittelwerte und Standardabweichungen bei der qPCR .....	133

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
ABC	aktivierte B-Zelle
ABL1	<i>Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1</i>
ad	auf das jeweilige Volumen auffüllen
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxoddisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter dem Graphen)
BCA	Bicinchoninsäure
BCL6	<i>B cell lymphoma 6</i>
BCP-ALL	<i>B-cell precursor-ALL</i> (Vorläufer-B-Zell-ALL)
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BLNK	<i>B Cell Linker</i>
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRD7	<i>Bromodomain Containing 7</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
c	circulär
ca.	circa
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	<i>Clinical remission</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>

crRNA	<i>crispr RNA</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (Zykluszahl-Schwellenwert)
DAG	Diacylglycerol
dFKS	dialysiertes FKS
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOT1L	<i>Disruptor of telomeric silencing 1-like</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ds	doppelsträngig
DUSP6	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	Elektronspray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	siehe FKS
FD	<i>FastDigest</i>
FKS	Fetales Kälberserum
for	<i>forward</i>
FOXO1	<i>forkhead box protein o1</i>
GCB	Keimzentrums-B-Zelle
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMALL	<i>German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
GOCC	<i>Gene Ontology Cellular Component</i>
GTP	Guanosintriphosphat

H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i>
HF	<i>high-fidelity</i>
h.i.	hitzeinaktiviert
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HOX	<i>homeobox</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRPO	Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ID3	<i>DNA-binding protein inhibitor 3</i>
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol-3-Phosphat
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
LYN	<i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
me	Methylierung
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MRD	Minimale Resterkrankung
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTX	Methotrexat
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH(+H <sup>+</sup> )	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

NJEH	Nicht-homologe Endverknüpfung ( <i>Non-homologous end joining</i> )
NP-40	4-Nonylphenyl-Polyethylenglycol
ov	Überexpression
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAS	<i>Periodic acid–Schiff stain</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBX1	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1</i>
PE	Phycoerythrin
Ph-	Philadelphia-
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLCγ2	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-Phosphodiesterase-gamma-2
Prä-BZR	Prä-B-Zellrezeptor
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
Prod.nr.	Produktnummer
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on Chromosome 10</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S	Aminosäure Serin
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat

Seq.	Sequenz
SH2	<i>Src-homology 2</i>
Ship1	<i>Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1</i>
SHP1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture</i>
SLC	<i>surrogate light chain</i>
SLP-65	siehe BLNK
S.O.C.	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SRC	<i>sarcoma</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
SWI/SNF	<i>switch/sucrose non-fermentable</i>
SYK	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
T	Aminosäure Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween 20
TCF3	<i>Transcription Factor 3</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeitanalyse bei Massenspektrometrie)
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TRH	<i>thyroid releasing hormone</i> TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenanteil (Volumen pro Volumen)
Verd.	Verdünnung
VpreB	<i>V-Set Pre-B Cell Surrogate Light Chain</i>
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Schachtelwort aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
w/v	Massenkonzentration (Masse pro Volumen)

## Verwendete Einheiten

Einheit	Bedeutung
°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
d	Tag
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol
min	Minute
RPM	<i>Rounds per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	unit

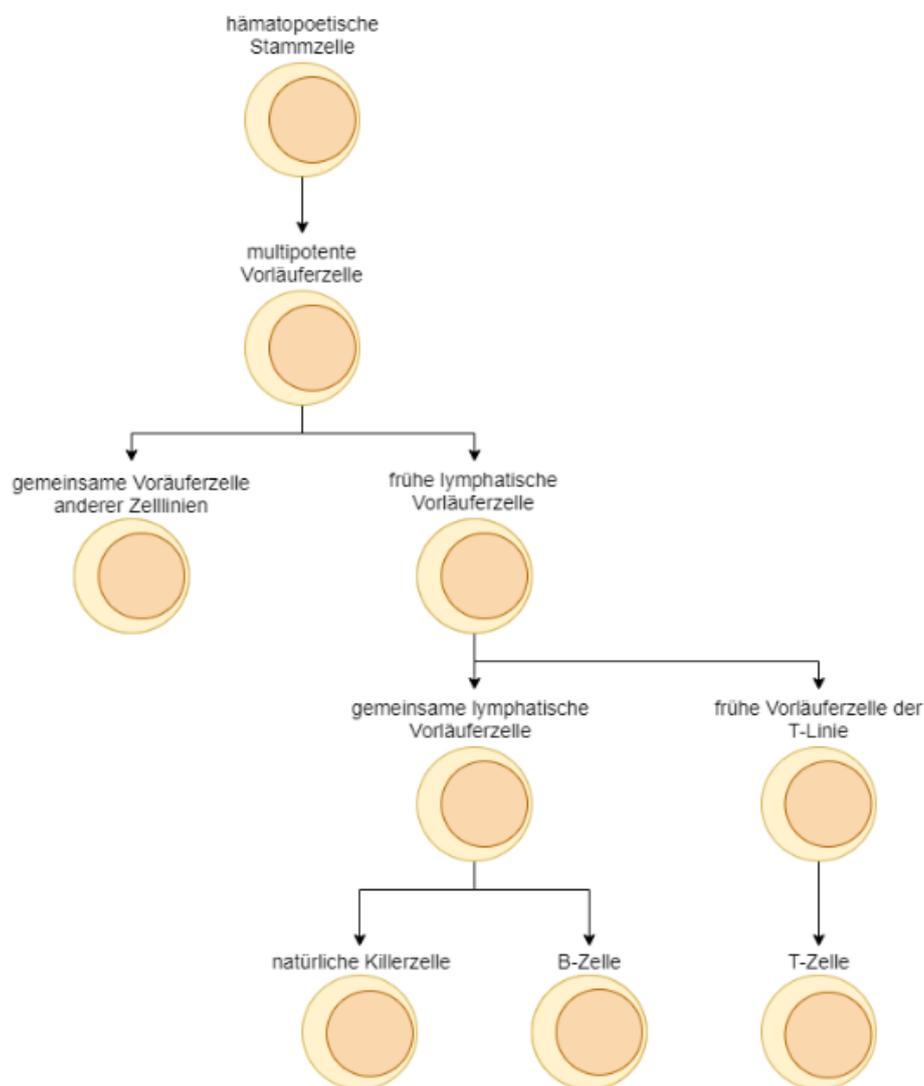
**Tabelle 1: In dieser Dissertationsarbeit verwendete Einheiten**

Kontextabhängig wird g einmal für Gramm und einmal für die Angabe der Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung (9,81 N/kg) verwendet.

# 1 Einleitung

## 1.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten gehören zu den Zellen des Immunsystems. Sie sind der lymphatischen Zellreihe der Leukozyten zuzuordnen und werden im Knochenmark gebildet. Dabei entwickeln sich B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle.<sup>1</sup> Die Bezeichnung „B-Zellen“ stammt ursprünglich von der *bursa fabricii*, einem Organ, in dem die B-Zellen bei Vögeln gebildet werden.<sup>2</sup> In Abbildung 1 ist die Entstehung von B-Zellen und anderen Immunzellen aus ihren Vorläuferzellen dargestellt.



**Abbildung 1: Entstehung der Zellen des Immunsystems** Alle Zellen gehen von einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle aus. Die Abbildung ist modifiziert nach Murphy et al.<sup>1</sup>

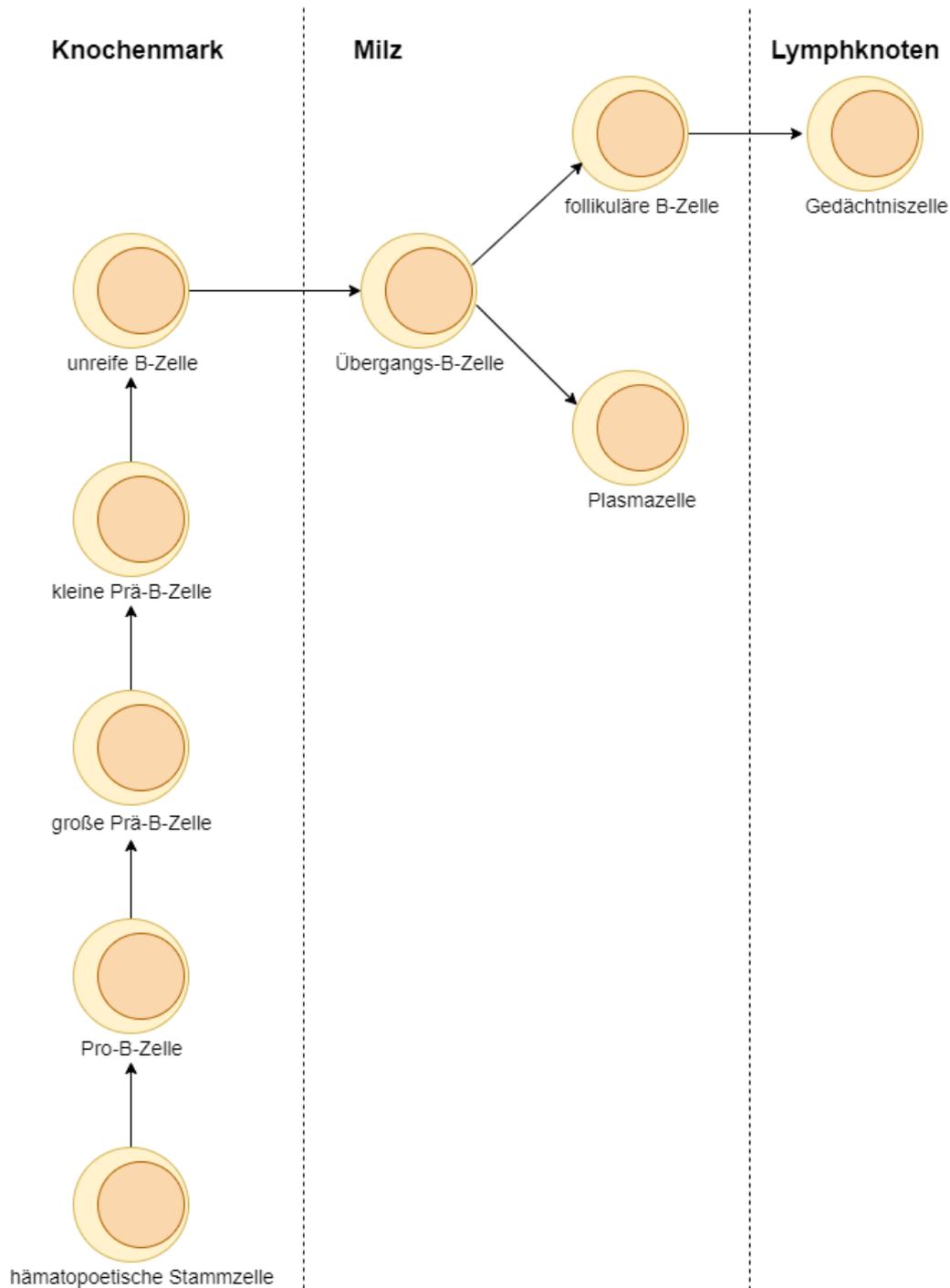
Die Bedeutsamkeit von Antikörpern für die Vermittlung von Immunität wurde 1890 erstmalig von von Behring und Shibasaburō beschrieben. 1949 konnte gezeigt werden, dass Antikörper von Plasmazellen gebildet werden; 1959 wurden die schweren und leichten Ketten der Antikörper erstmalig genauer charakterisiert. Letztendlich wurde 1965 festgestellt, dass es sich bei B- und T-Zellen um zwei getrennte Zelllinien handelt.<sup>2</sup>

Zusammen mit den T-Lymphozyten sind B-Zellen Teil des adaptiven Immunsystems und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen. Während T-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunantwort bedeutsam sind, sind B-Lymphozyten Teil der humoralen Immunantwort. Nach Kontakt mit Antigenen sind sie in der Lage, sich in Plasmazellen umzuwandeln und Antikörper zu bilden. Aufgrund von vielfältigen Rekombinationen in den schweren und leichten Ketten der Antikörper entsteht eine große Diversität an Antigenbindungsstellen.<sup>3</sup> Darüber hinaus können sich B-Lymphozyten in Gedächtniszellen umwandeln und ihre Affinität für ein bestimmtes Antigen für lange Zeit aufrechterhalten. Außerdem präsentieren sie die Antigene in einem Komplex mit *major histocompatibility complex*- (MHC-) Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Sie werden daher auch als „antigen-präsentierende Zellen“ bezeichnet.<sup>1</sup> Erkennen T-Lymphozyten diesen Antigen-Komplex, werden die Oberflächenmarker CD40 und CD154 miteinander verbunden, was die Expansion der T-Lymphozyten vorantreibt.<sup>4</sup> Des Weiteren spielen regulatorische B-Zellen (B<sub>regs</sub>) eine Rolle bei der Immunsuppression, da sie in der Lage sind, die inflammatorische T-Zellaktivierung durch die Sekretion des Zytokins IL-10 zu verhindern.<sup>5</sup> Außerdem können B-Lymphozyten T-Helferzellen durch die Produktion des Zytokins TGFβ (*transforming growth factor beta*) in die Apoptose treiben.<sup>6</sup>

Dieser Aspekt zeigt, dass B-Zellen bei Dysregulation der Signalwege Ursprung von Autoimmunität sein können. Andererseits können B-Zellen bei zu wenig immunsuppressiven Einflüssen Ursprung von Immundefizienz und malignen Erkrankungen sein.<sup>3</sup> Je nachdem von welcher Entwicklungsstufe die maligne Entartung ausgeht, entstehen unterschiedliche Erkrankungen wie Leukämien oder Lymphome.<sup>1</sup> Akute lymphatische Leukämien (ALL) gehen beispielsweise

von den Vorläuferzellen der B-Lymphozyten aus. Auf diesen Aspekt werde ich in 1.2 näher eingehen.

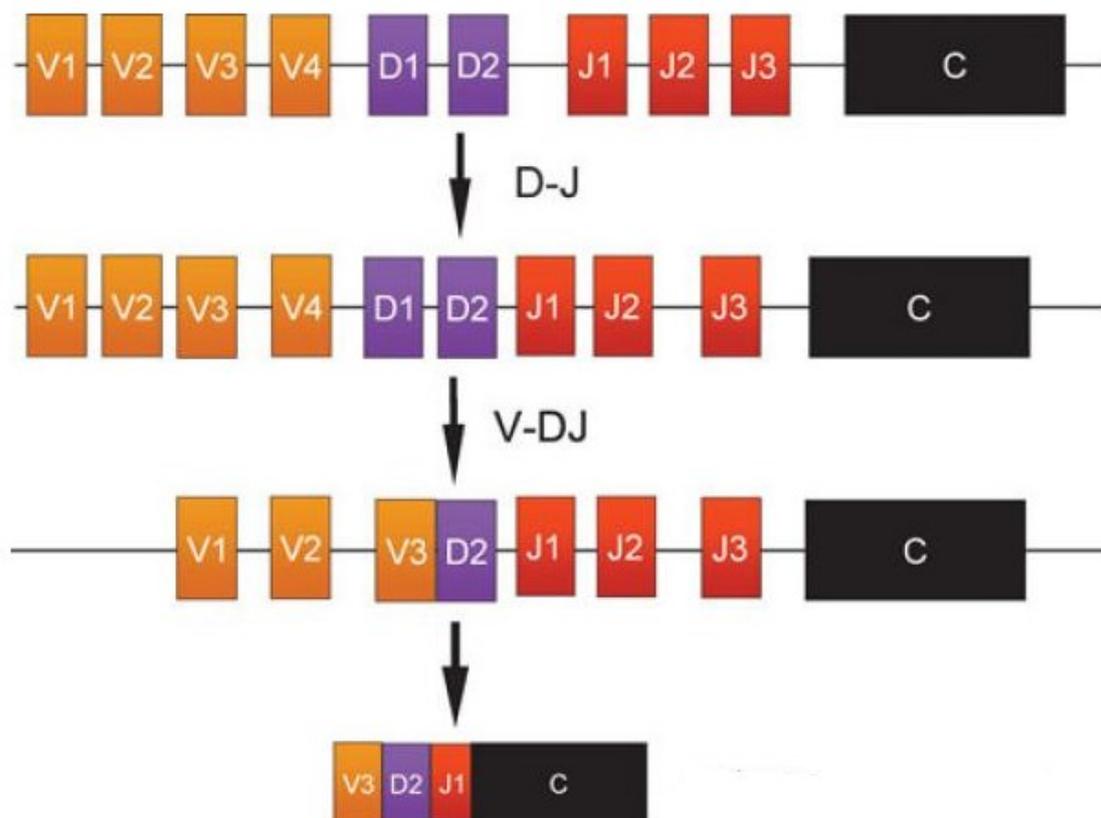
### 1.1.1 Reifung der B-Zellen und Antikörperentwicklung



**Abbildung 2: Entwicklung von B-Zellen in unterschiedlichen Organen** Die Hämatopoese findet überwiegend im Knochenmark statt. Die Abbildung ist modifiziert nach Pieper *et al.*<sup>3</sup>

Wie in Abbildung 2 dargestellt, geschieht die Reifung der B-Lymphozyten – die sogenannte Hämatopoese – im Knochenmark über einige Vorstufen aus

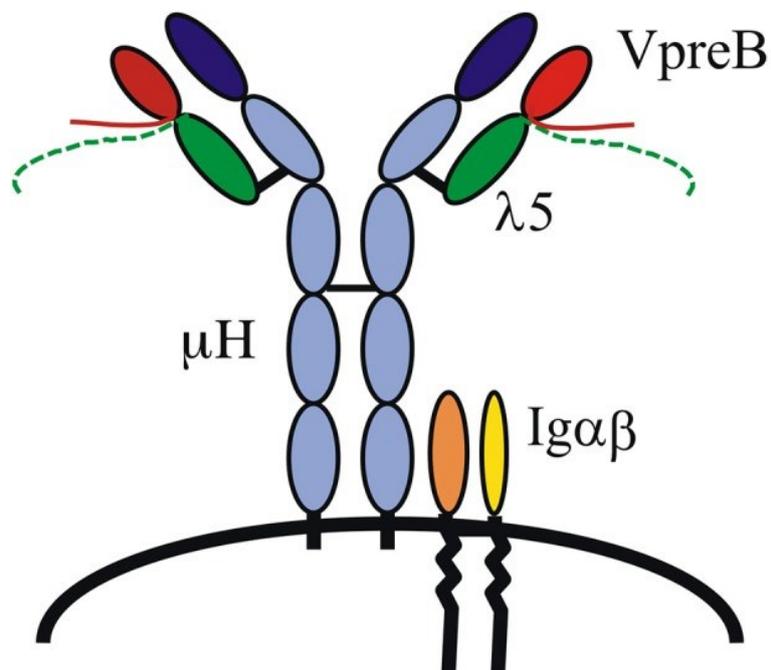
pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferstammzellen.<sup>7</sup> Im Rahmen der B-Zelldifferenzierung findet auch die Antikörperentwicklung der B-Zellen statt. Die Antikörper, welche zu Beginn der B-Zell-Entwicklung membranständig lokalisiert sind, bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (siehe 1.1.2). Die variablen Regionen der Ketten bilden die Antigenbindungsstelle, welche jeweils durch Rekombination der unterschiedlichen Gensequenzen V (*variable*), J (*joining*) – und bei schweren Ketten zusätzlich D (*diversity*) – gebildet wird. Die *recombination-activating gene* (RAG)-1- und -2-Enzyme lagern dabei zunächst die D- und J-Segmente der schweren Kette um, sodass die Zellen in das Stadium der Pro-B-Zellen übergehen.<sup>8</sup> Pro-B-Zellen tragen die frühen B-Zell-Marker CD19, CD22 und CD79a auf ihrer Oberfläche. Im nächsten Schritt exprimieren sie zusätzlich CD10 und das V-Segment der schweren Kette wird hinzugefügt.<sup>9</sup> Der Vorgang der VD(J)-Rekombination in der schweren Kette wird beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der VD(J)-Rekombination in der schweren Kette der Immunglobuline** Zunächst werden ein D- und ein J-Segment ausgewählt (hier D2 und J1), anschließend wird ein V-Segment angekoppelt (hier V3). Nach dem Splicen zeigt sich eine individuelle Antigenbindungsstelle. Die Abbildung ist modifiziert nach Roth.<sup>9</sup>

Im Anschluss findet eine Umlagerung des  $\mu$ -Segmentes der schweren Kette statt, sodass zytoplasmatisches IgM entsteht.<sup>10</sup> Die Zellen werden nun als Prä-B-Zellen bezeichnet.

Der für dieses Stadium charakteristische Prä-B-Zellrezeptor- (Prä-BZR-) Komplex besteht aus dem umgelagerten  $\mu$ -Segment, VpreB,  $\lambda 5$  sowie dem Heterodimer aus Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b), welche für die Weiterleitung des Signals notwendig sind (siehe Abbildung 4). VpreB und  $\lambda 5$  bilden zusammen ein Molekül, das der leichten Kette des späteren B-Zellrezeptors (BZR) ähnelt<sup>11</sup>, und werden daher auch als *surrogate light chain* (SLC) bezeichnet.<sup>12</sup>



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prä-BZR** Der Prä-BZR besteht aus zwei schweren Ketten ( $\mu H$ ), VpreB,  $\lambda 5$  sowie dem Heterodimer aus Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ . Die Abbildung ist modifiziert nach Winkler und Mårtensson.<sup>13</sup>

Die Prä-B-Zellen proliferieren zunächst und werden dann zu kleinen ruhenden Prä-B-Zellen. Dabei findet eine Rekombination in den leichten Ketten statt. Da bei den leichten Ketten keine D-Segmente vorkommen, werden nur die V- und J-Segmente umgelagert.<sup>9</sup> Dies geschieht bei den während der Embryonalentwicklung in der Leber vorkommenden Zellen ab der 9. Gestationswoche.<sup>14</sup> Durch diese Rekombinationen der schweren und leichten Ketten kann die hohe Diversität an Antigenbindungsstellen gewährleistet werden. Dies ermöglicht es, mehr als  $5 \cdot 10^{13}$  unterschiedliche Pathogene zu erkennen.<sup>3</sup> Als nächstes wird VpreB durch die schwere Kette ausgetauscht; es entsteht IgM,

welches etwa ab der 11. Gestationswoche auch auf der Oberfläche der Zellen auftritt.<sup>10,14</sup> Dieses membranständige IgM stellt den Rezeptor der B-Zelle dar. Die Zellen werden nun als unreife B-Zellen bezeichnet und wandern in sekundär lymphatisches Gewebe wie die Milz aus.<sup>7</sup>

Die naiven B-Zellen zirkulieren nun so lange, bis sie ihr passendes Antigen finden. Nach Antigenkontakt erfolgt die weitere Aktivierung entweder T-Zell-abhängig oder T-Zell-unabhängig durch Lipopolysaccharide oder Glykolipide. Bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung entstehen kurzlebige Plasmazellen mit geringer Affinität. Bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung präsentieren die B-Zellen den folliculären T-Helferzellen das jeweilige Antigen. Erkennt die T-Zelle dieses, wandert die B-Zelle in die Keimzentren der sekundär lymphatischen Gewebe aus.<sup>15</sup> Im Keimzentrum kann die Affinität der B-Zellen durch somatische Hypermutationen durch das Enzym *Activation-induced cytidine deaminase* (AID) erhöht werden.<sup>16</sup> Nun wird das Antigen durch dendritische Zellen präsentiert um die Affinität der B-Zellen zu überprüfen: B-Zellen mit zu geringer Affinität werden in die Apoptose getrieben; Lymphozyten mit hoher Affinität differenzieren sich weiter in langlebige Gedächtniszellen oder in antikörperproduzierende Plasmazellen. Außerdem können Zytokine folliculärer T-Zellen einen Antikörper-Klassenwechsel der B-Zellen durch Rekombinationen in den konstanten Regionen der schweren Ketten bewirken.<sup>4,15</sup>

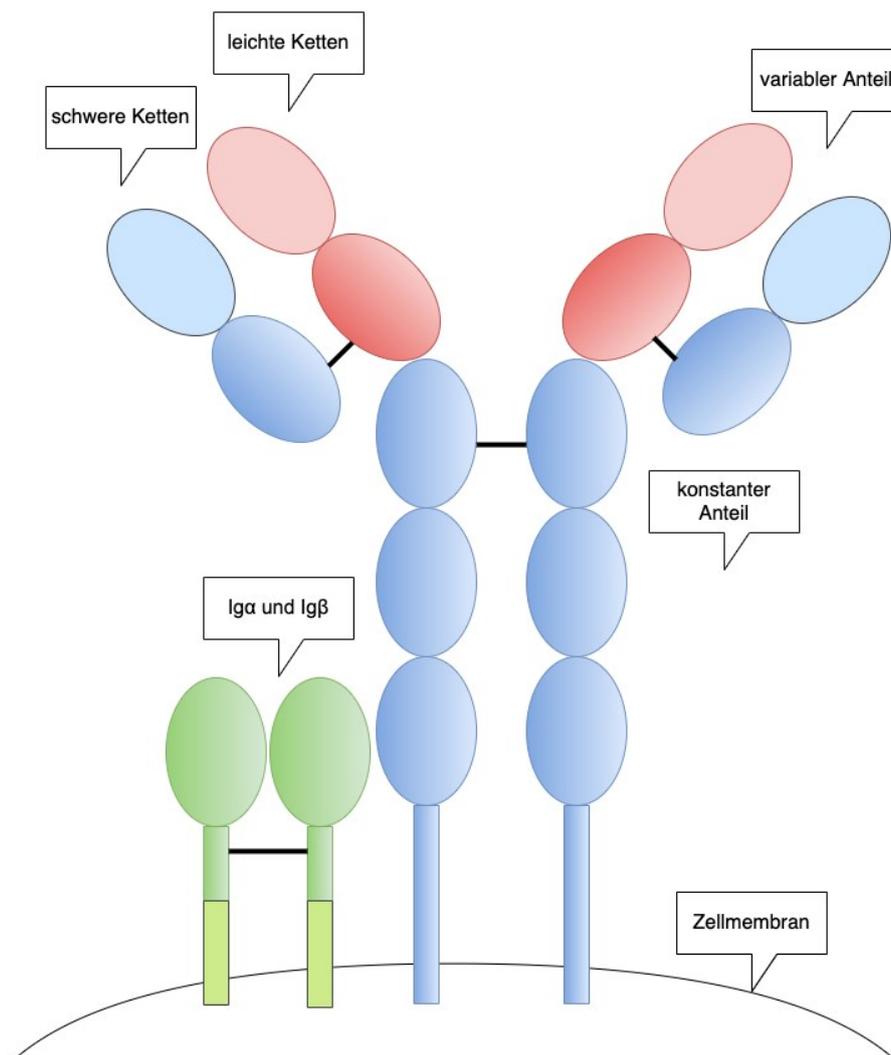
Die Produktion der Prä-B-Zellen wird etwa ab der 12. Gestationswoche von dem Knochenmark übernommen. Während zu Beginn der Embryonalentwicklung mehr Prä-B-Zellen als reife B-Zellen in der fetalen Leber vorkommen, sind etwa ab der 14. Gestationswoche mehr reife B-Zellen vorhanden. Im fetalen Knochenmark lassen sich während der gesamten Entwicklung mehr Prä-B-Zellen als reife B-Zellen finden.<sup>17</sup>

### **1.1.2 Der B-Zellrezeptor (BZR)**

Der BZR besteht aus einem membranständigen Antikörper sowie einem Heterodimer aus Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b). Der Antikörper wiederum besteht aus zwei schweren und zwei leichten Proteinketten, welche jeweils einen konstanten und einen variablen Anteil besitzen und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Durch Rekombination entstehen eine Vielzahl von

unterschiedlichen Antigenbindungsstellen (siehe 1.1.1). Die Signalweiterleitung erfolgt über  $I\gamma\alpha$  und  $I\gamma\beta$ , welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und jeweils eine ITAM-Sequenz (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) besitzen. Durch Bindung eines Liganden wird eine Kaskade von Kinasen aktiviert, welche zur Aktivierung verschiedener Signalwege – wie beispielweise des Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K-) und des Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Wegs – führt.<sup>3,18</sup>

In Abbildung 5 ist der Aufbau des BZR<sub>s</sub> schematisch dargestellt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des BZR<sub>s</sub>** Der BZR besteht aus einem membranständigen Antikörper, welcher aus zwei schweren (*blau*) und zwei leichten (*rot*) Ketten aufgebaut ist, und einem Heterodimer aus  $I\gamma\alpha$  und  $I\gamma\beta$ . Dieses ist über seine ITAM-Anteile (*hellgrün*) für die Signalweiterleitung in das Zellinnere zuständig. Die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline besitzen jeweils einen konstanten (*dunkler schraffiert*) sowie einen variablen Anteil (*heller schraffiert*) und sind über Disulfidbrücken (*schwarze Striche*) miteinander verbunden. Die Abbildung ist modifiziert nach Murphy *et al.*<sup>1</sup>

### 1.1.3 Prä-B-Zellen

In meiner Dissertationsarbeit habe ich mich mit den Signalwegen bei einer Form der ALL beschäftigt, welche von einer Vorstufe der B-Zellen – den Prä-B-Zellen – ausgeht. Daher möchte ich im Folgenden die Bedeutung des Prä-BZRs für die Proliferation der Zellen sowie die von ihm ausgehenden Signalwege in Prä-B-Zellen genauer erläutern.

#### 1.1.3.1 Signalwirkung in Prä-B-Zellen

Der Prä-BZR spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Hämatopoese, da er einen Kontrollpunkt bei der Differenzierung der Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle darstellt.<sup>19</sup> Im Stadium der frühen Prä-B-Zellen teilen sich die Zellen etwa 5 bis 6 Mal. Während dieser klonalen Vermehrung werden die Gene, die für die SLC kodieren, herunterreguliert.<sup>20</sup> Nach Ende der Zellteilungen initiiert der Prä-BZR die Umlagerung der leichten Kette. An diesem Punkt wird sichergestellt, dass nur Zellen mit einem funktionalen Prä-BZR weiter ausreifen; wie bereits unter 1.1.1 erläutert wird anderenfalls die Apoptose eingeleitet.<sup>21</sup> Man spricht von einer „positiven Selektion“. Bei akuter lymphatischer Leukämie, die von Vorläufer-B-Zellen ausgeht (BCP-ALL), bleiben die Zellen in ihrer Entwicklung an diesem Kontrollpunkt stehen und beginnen sich unkontrolliert zu teilen.<sup>19</sup>

Darüber hinaus interagiert VpreB des Prä-BZRs mit der *IgH chain complementarity region 3* (H-CDR3) an Tyrosin 101, was einen Einfluss auf die Auswahl der V-Genomsequenzen bei der Rekombination der schweren Kette hat.<sup>13</sup>

Des Weiteren hemmt der Prä-BZR die V- zu DJ-Rekombination der zweiten Kette, wenn bei der ersten Kette bereits eine Umlagerung stattgefunden hat. Dieser Prozess wird als Allelausschluss (*allelic exclusion*) bezeichnet. Die Sicherstellung, dass immer nur eine der beiden Ketten rekombiniert wird, hat zur Folge, dass immer nur BZRs mit einer einzigen Antigen-spezifität gebildet werden.

Marshall *et al.* publizierten, dass Interleukin-7 (IL-7) eine bedeutsame Rolle bei der Entwicklung der B-Zellen spielt und dass das Fehlen dieses Zytokins zu einer Blockade der Entwicklung im Stadium der Pro-B-Zelle führt. In dieser Situation steigert der Prä-BZR die Expression des Interleukin-7-Rezeptors auf der

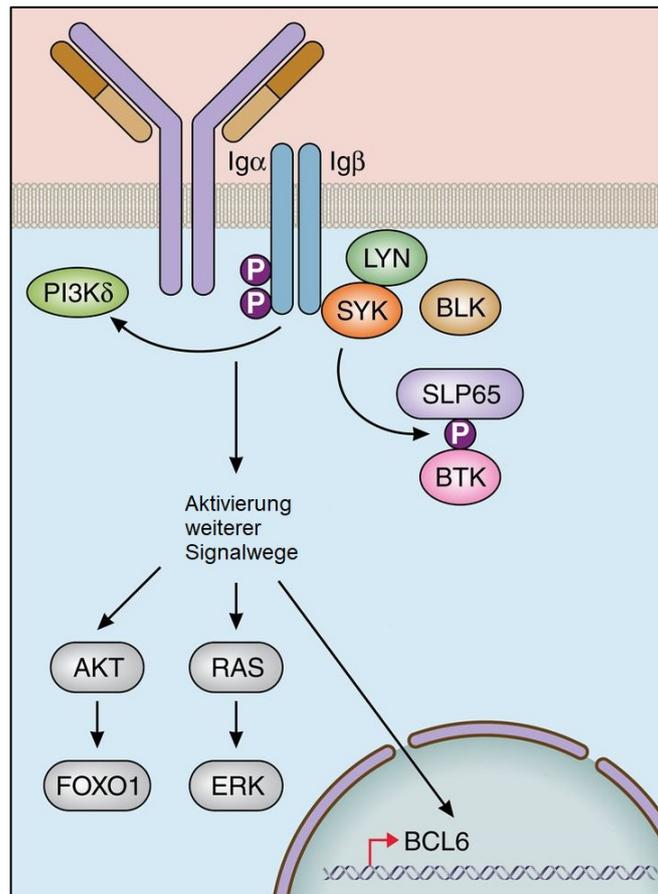
Zelloberfläche. Gleichzeitig kann er das Wachstum der Prä-B-Zellen hemmen, indem er über Modifikation des IL-7-Rezeptors die Empfindlichkeit der Zellen für IL-7 herunterreguliert.<sup>22</sup>

Wie unter 1.1.3.2 erläutert spielt die Autoreaktivität von  $\lambda 5$  bei der Initiierung des Prä-BZR-Signalwegs eine wichtige Rolle.<sup>13</sup>

Außerdem existiert eine negative Rückkopplungsschleife, die bei einer Aktivierung des Signalwegs zum Abbau des Prä-BZRs führt: Bei Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs wird das Transmembranrezeptor LPTM5 (*Lysosome-Associated Protein Transmembrane 5*) exprimiert. Dieses führt zum lysosomalen Abbau der intrazellulären Prä-BZR und hat damit auch eine verminderte Versorgung der Zelloberfläche mit den Rezeptoren zur Folge.<sup>23</sup>

### **1.1.3.2 Bedeutung der Signalwege *downstream* des Prä-BZRs**

In Abbildung 6 sind der Prä-BZR sowie die von ihm ausgehenden Signalwege schematisch dargestellt. In der Literatur ist beschrieben, dass es einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede im Signalweg von Prä-BZR und BZR gibt. Während der BZR durch Bindung von Liganden aktiviert wird, ist es noch unklar, ob der Prä-BZR durch Auto-Vernetzung der leichten Ketten oder durch Ligandenbindung aktiviert wird. Ohnishi und Melchers konnten zeigen, dass der Nicht-Immunglobulin-Teil des  $\lambda 5$ , der positiv geladen ist, sehr reaktiv ist und eine Interaktion des Prä-BZRs mit vielen unterschiedlichen Molekülen herbeiführen kann.<sup>24</sup> Die Aktivierung des Prä-BZRs führt zur Phosphorylierung von ITAM-Sequenzen von Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b) durch Mitglieder der SRC-Proteintyrosinkinase-Familie. Auf diese Weise werden Andockstellen für die SH2-(*Src-homology 2*-) Domänen der Kinasen SYK und LYN geschaffen.<sup>25</sup> Nun folgt die Autophosphorylierung und somit Aktivierung von SYK. Infolgedessen aktivieren SYK und andere SH2-Domänen-tragende Kinasen viele unterschiedliche Signalwege, indem sie ihre Effektormoleküle phosphorylieren.



**Abbildung 6: Signalwege des Prä-BZR und beteiligte Proteine** Nach Aktivierung des Prä-BZR werden die Kinasen SYK und LYN aktiviert. Diese initiieren nun viele unterschiedliche Signalwege, indem sie diverse Effektormoleküle phosphorylieren. Die Abbildung ist modifiziert nach *Iacobucci*.<sup>26</sup>

### 1.1.3.2.1 PI3K-Signalweg

Unter anderem wird durch SYK das Adapter-Protein *B-cell PI3K adaptor* phosphoryliert, welches eine Aktivierung der katalytischen  $\delta$ -Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) bewirkt.<sup>21</sup> Die PI3-Kinase phosphoryliert nun das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). An dieses bindet die Kinase PDK1 über ihre *Pleckstrin-Homologie* (PH)-Domäne, wodurch die Serin-/Threoninkinase AKT (auch Proteinkinase B genannt) durch Phosphorylierung an Threonin 308 partiell aktiviert wird. Anschließend kann AKT durch mTOR oder durch mit PI3K verwandte Kinasen an Serin 473 phosphoryliert werden, jedoch haben Fillipa *et al.* herausgefunden, dass diese zweite Phosphorylierung für die vollständige Aktivierung von AKT nicht zwingend erforderlich ist.<sup>27</sup> Der Tumorsuppressor PTEN hemmt die Aktivität von AKT,

indem er  $PIP_3$  dephosphoryliert.<sup>28</sup> Außerdem kann AKT durch die Proteinphosphatase 2 dephosphoryliert werden.

Der zweite Weg, der von  $PIP_2$  ausgeht, ist die Hydrolyse durch Phospholipase C2 in die *Second Messenger* Inositol-3-Phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 führt zum Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG membranständig bleibt und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Dies hat die Aktivierung weiterer Signalwege zur Folge.<sup>1</sup>

Eine vermehrte Aktivierung des PI3K-Signalwegs bzw. der Proteinkinase AKT wurde in verschiedenen Leukämie-Formen gezeigt und ist bereits als therapeutischer Ansatzpunkt in Betracht gezogen worden. 1991 wurde AKT erstmalig von Coffey und Woodgett beschrieben.<sup>29</sup> 1998 erläuterte Eves die antiapoptotische Wirkung von AKT in Ratten-Zellen: Eine Steigerung der Aktivität von AKT erhöhte in diesen Organismen die Überlebensraten neuronaler Zellen.<sup>30</sup>

Außerdem phosphoryliert SYK gemeinsam mit der Bruton-Tyrosinkinase (BTK), welche im PI3K-Signalweg aktiviert wird, das Adapterprotein BLNK. Dieses wird auch als *SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa* (SLP65) bezeichnet. Über Aktivierung des *RAS-extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalwegs kann es den Zellzyklus vorantreiben. Gleichzeitig kann es jedoch auch den Zellzyklus hemmen, indem es die Aktivierung von AKT blockiert, wodurch auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *B cell lymphoma 6* (BCL6) durch *forkhead box protein o1* (FOXO1) gehemmt wird. Dadurch wird die Transkription des Regulatorproteins MYC (*Myelocytomatosis*) sowie des Zellzyklusinhibitors Cyclin D2 gefördert.<sup>25</sup>

#### **1.1.3.2.2 ERK-Signalweg**

Innerhalb des Ras/ERK/MEK-Wegs werden drei Signalwege unterschieden, die durch verschiedene Moleküle ausgelöst werden und unterschiedliche Kinasen aktivieren. Im Folgenden werde ich auf den ERK1/2-Signalweg näher eingehen, da auf diesem in dieser Dissertationsarbeit der Fokus liegt.

Die *Guanosin Triphosphatase* (GTPase) Ras hat in ihrer inaktiven Form Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Die Aktivierung geschieht durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), welche zu einer Ablösung des GDPs von

Ras führen. Aufgrund der höheren Konzentration von GTP im Zytoplasma kann dieses nun an Ras binden, welches dadurch in seine aktivierte Form übergeht. Die Inaktivierung von Ras findet durch seine intrinsische Aktivität statt, die eine Dephosphorylierung zu GDP bewirkt. Dieser Vorgang kann unterstützt werden durch GTP-Austauschfaktoren, sogenannten *GTPase-activating proteins* (GAPs).<sup>31,32</sup>

Die Signalkaskade des Ras/ERK-Wegs kann durch Bindung von EGF (*epidermal growth factor*) an den EGF-Rezeptor initiiert werden. In Prä-B-Zellen wird Ras durch Anheften des *Guanine Nucleotide Releasing Protein 3* (RasGRP3) aktiviert, welches zur Kategorie der GEFs zählt. Die Phospholipase PLC $\gamma$ 2, welche in dem Signalweg aktiviert wird, führt zur Bildung von DAG an der Plasma-Membran. Dieses bewirkt die räumliche Annäherung und Interaktion von RasGRPs und Ras.<sup>33</sup> Durch Aktivierung von Ras wird die Serin/Threonin-Kinase B-Raf an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert die Kinasen MEK1 und MEK2.<sup>34</sup> Nun phosphorylieren diese die Kinasen ERK1 und ERK2 an Tyrosin- und Threoninresten. Bei ERK2 handelt es sich um Thr138 und Tyr185<sup>35</sup>; zur Aktivierung müssen beide Reste phosphoryliert werden. ERK kann nun seinerseits Effektormoleküle phosphorylieren und Signalwege aktivieren.

Die Bedeutung der Kinase ERK im MAP-Kinase-Signalweg wurde für antiproliferative Vorgänge bereits in der Literatur beschrieben: Kortylewski *et al.* erläuterten, dass eine Inhibition von ERK1/2 durch Herunterregulation des *Cyclin-dependent kinase* (Cdk) *inhibitors* p27/Kip1 zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase führt.<sup>36</sup> Außerdem hat eine MAPK-Inhibition eine Dephosphorylierung und damit Aktivierung der proapoptischen Bcl-2-Faktoren Bad (*BCL2 associated agonist of cell death*) und Bim (*Bcl-2-like protein 11*) zur Folge.<sup>37,38</sup> Eine Aktivierung des ERK-Signalwegs über die Kinase Raf bewirkt hingegen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B.<sup>39</sup> Tang *et al.* gaben an, dass eine Aktivierung des Signalwegs grundsätzlich das Zellwachstum fördert, dass es jedoch unter bestimmten Bedingungen auch zur Apoptoseeinleitung kommen kann: Bei Auftreten von DNA-schädigenden Stimuli wie ionisierender Strahlung oder Exposition mit einigen Zytostatika führt eine Aktivierung von ERK1/2 zur Aktivitätssteigerung der proapoptischen Faktoren

p53 und Caspase 3 sowie zur Expression des Regulatorproteins Bax (*BCL2 associated X protein*).<sup>40,41</sup>

## **1.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)**

Leukämien bezeichnen Erkrankungen des blutbildenden Systems, bei denen es zur klonalen Vermehrung von blutbildenden Zellen oder ihren Vorläuferzellen kommt. Die Vorläuferzellen, welche bei akuten Leukämien proliferieren, werden als Blasten bezeichnet und können meistens in großer Anzahl im Knochenmark sowie – bei weiterer Proliferation – auch im peripheren Blut nachgewiesen werden.<sup>42</sup> Je nach Ursprungszelle, von der die Entartung ausgeht, werden verschiedene Leukämieformen unterschieden: Die beiden großen Gruppen sind die myeloischen und die lymphatischen Leukämien. Darüber hinaus unterscheidet man bei den lymphatischen Leukämien, ob sie von B-Zellen, T-Zellen oder von deren Vorläuferzellen ausgehen.

Die ALL ist im Kindesalter mit 80 % aller Leukämien in Europa die häufigste maligne Erkrankung, bei Erwachsenen macht sie jedoch nur 15 % der Leukämien aus.<sup>10</sup> Ein Großteil der Erkrankungen tritt bei Kindern im Alter von 0 bis 4 Jahren auf, jedoch gibt es einen zweiten Inzidenzpeak im Alter von etwa 60 Jahren.<sup>43</sup> In Europa beträgt die Inzidenz (gemittelt über alle Lebensalter) 1,28 pro 100.000 Einwohner. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,44 pro 100.000 für Männer und 1,21 pro 100.000 Einwohner für Frauen).<sup>44</sup>

Die sich unkontrolliert vermehrenden Zellen verdrängen im Knochenmark die anderen blutbildenden Zelllinien, sodass es zu einer Panzytopenie mit den folgenden Symptomen kommen kann: Abgeschlagenheits- und Schwächegefühl durch Anämie,<sup>45</sup> Infektanfälligkeit aufgrund von Granulozytopenie und Blutungsneigungen durch Thrombozytopenie.<sup>10</sup> Meistens treten die Symptome akut auf. Außerdem kann es zu B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sowie zu Lymphknotenschwellungen kommen.<sup>42</sup> Des Weiteren treten oftmals Gelenk- und Knochenschmerzen auf,<sup>46</sup> da akute Leukämien häufig mit rheumatischen Erkrankungen assoziiert sind.<sup>47</sup> Hepato-/Splénomegalie tritt meistens eher bei akuter myeloischer Leukämie (AML) auf, kann jedoch auch bei den lymphatischen Leukämien vorkommen. Darüber hinaus können kraniale

Neuropathie, Übelkeit und Papillenödem als Zeichen einer kranialen Beteiligung auftreten.<sup>48</sup>

### **1.2.1 Klassifikationen**

In den Studien der deutschen Studiengruppe GMALL (*German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*), in welchen Therapieempfehlungen zur Behandlung der ALL etabliert wurden, werden je nach Ursprungszelle folgende Untergruppen unterschieden:<sup>10,48</sup>

- Pro-B-Zell-ALL (= frühe Prä-B-ALL)
- Common ALL
- Prä-B-ALL
- reife/mature B-ALL

Die T-Zell-Leukämien lassen sich ebenfalls weiter einteilen:

- Pro-T-ALL
- Prä-T-ALL
- kortikale/intermediäre T-ALL
- reife T-ALL

In meiner Dissertationsarbeit habe ich mich überwiegend mit der Prä-B-Zell-ALL beschäftigt, weswegen ich die B-Zell-ALL im Folgenden genauer charakterisieren möchte:

#### **1.2.1.1 FAB-Klassifikation**

1976 veröffentlichten Bennett *et al.* die FAB-Klassifikation, eine Klassifikationsmöglichkeit akuter Leukämien, die von einer Gruppe von französischen, amerikanischen und britischen Wissenschaftlern entwickelt worden war. Danach wird die ALL anhand der Morphologie der Zellen eingeteilt, die im peripheren Blut vermehrt auftreten. Man unterscheidet die Gruppen L1, L2 und L3. Bei L1 kommen kleine Zellen vor, die meistens keine große Heterogenität aufweisen. Zellen bei L2 sind doppelt so groß wie die bei L1 vorkommende Zellen und sind durch eine große Heterogenität gekennzeichnet. Die Zellkernform ist unregelmäßig, große Nukleoli sind in den meisten Fällen vorhanden. Bei L3 handelt es sich um den Burkitt-Typ. Diese Zellen sind groß mit basophilem Zytoplasma und prominenten Vakuolen.<sup>49</sup>

### 1.2.1.2 WHO-Klassifikation

Nach der WHO-Klassifikation, welche zuletzt 2016 aktualisiert wurde, erfolgt eine Einteilung der B-lymphoblastischen Leukämien und Lymphome anhand auftretender genetischer Anomalien:

genetische Anomalie	Veränderung auf Proteinebene
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1-Fusionsprotein
t(v;11q23)	MLL-rekombinierte Leukämie
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)-Fusionsprotein
Hyperdiploidie	
Hypodiploidie	
t(5;14)(q31;q32)	IL3-IGH-Fusionsprotein
t(1;19)(q23;p13.3)	TCF3-PBX1-Fusionsprotein

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation der B-Zell-Leukämien und Lymphome anhand genetischer Anomalien** Die resultierenden Veränderungen auf Proteinebene sind in der rechten Spalte angegeben. Die Tabelle ist modifiziert nach der AWMF-S1-Leitlinie<sup>50</sup> und nach Arber *et al.*<sup>51</sup>

### 1.2.2 Genetische Modifikationen

Die molekularen Hintergründe von Leukämien sind Gegenstand jahrzehntelanger Forschung. Noch immer sind viele molekulare Mechanismen nicht ausreichend verstanden. In über 75 % der pädiatrischen ALL-Fälle lassen sich genetische Aberrationen feststellen,<sup>52</sup> die auch als Grundlage für die WHO-Klassifikation dienen (siehe 1.2.1.2).

1982 untersuchten Williams *et al.* den Einfluss von Veränderungen der Chromosomenzahl auf den Verlauf von ALL. Die beste Prognose hatten Patienten mit Hyperploidie, die schlechteste zeigte sich bei Pseudodiploidie.<sup>53</sup> Mit 17 % ist die TEL-AML1-Translokation die häufigste Translokation der ALL im Kindesalter.<sup>54</sup> Sie ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert.<sup>55</sup> Auch eine Deletion des DNA-Bindeproteins DKFZ1 führt bei pädiatrischer ALL zu einer schlechteren Prognose.<sup>56</sup>

Die Translokation t(9;22)(q34;q11.2) führt zur BCR-ABL-Translokation; Zellen mit dieser genetischen Modifikation werden als Philadelphia-positive (Ph+) Zellen

bezeichnet. 1970 wurde die Translokation von Propp und Lizzi erstmals bei einem Patienten mit ALL beschrieben.<sup>57</sup> Zuvor war sie nur bei chronisch myeloischen Erkrankungen festgestellt worden und galt als pathognomonisch für diese.<sup>57,58</sup> Burmeister *et al.* stellten jedoch fest, dass 34 % aller zwischen 2000 und 2007 in der GMALL-Studie analysierten Erwachsenen eine BCR-ABL-Translokation tragen.<sup>59</sup> Bei Kindern sind es hingegen nur etwa 5 %.<sup>60</sup> Das Auftreten von Philadelphia-positiven Zellen ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert.<sup>61</sup> 2009 entdeckte Den Boer eine Subgruppe mit einer BCR-ABL-ähnlichen Genexpression. Vergleichbar mit Ph+-ALL war sie mit einer schlechten Prognose assoziiert, da die Patienten eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 59,5 % zeigten.<sup>62</sup>

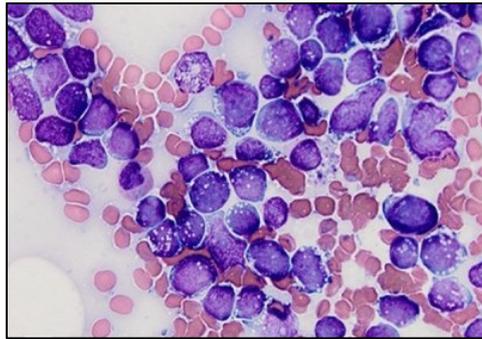
Mixed-lineage-Leukämien (MLL) sind eine Untergruppe von Leukämien, bei denen eine Rekombination des MLL-Gens stattfindet, welches sich auf 11q23 befindet.<sup>63,64</sup> Dadurch kommt es zu einer Bildung von Fusionsproteinen. Die häufigsten Gene, die mit dem MLL-Gen fusioniert werden, sind AF4, AF9, ENL und AF10 (siehe Abbildung 15). Leukämien mit MLL-Rekombination sind ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert.<sup>65</sup>

### **1.2.3 Diagnostik**

Bei der Diagnostik der ALL spielt die körperliche Untersuchung zur Detektion der oben beschriebenen Symptome (siehe 1.2) eine wichtige Rolle. Im peripheren Blut finden sich Zeichen einer Anämie und Thrombozytopenie. Es kann eine Lymphozytose auftreten, jedoch kann die Leukozytenzahl auch normal oder erniedrigt sein. Erhöhte LDH- und Harnsäurewerte sind Zeichen eines erhöhten Zellerfalls. Im peripheren Blut wird außerdem auf Zeichen eines Nierenversagens geachtet, da dies einen Risikofaktor für ein Tumorlysesyndrom (siehe 1.2.4) bei Chemotherapie-Gabe darstellt.<sup>10</sup> Tumorlyse führt zu einem Anstieg von Harnsäure, Kalium und Phosphat im Urin nach Gabe von Chemotherapeutika und wurde bereits in den 1960er Jahren beschrieben.<sup>66,67</sup>

Die Diagnosestellung erfolgt jedoch durch eine Knochenmarkspunktion, bei der mehr als 25 % Blasten im Knochenmarksblut nachgewiesen werden können (Abbildung 7). ALL-Zellen sind PAS-positiv und Peroxidase- sowie Esterase-negativ. Anschließend können die Blasten morphologisch betrachtet werden und

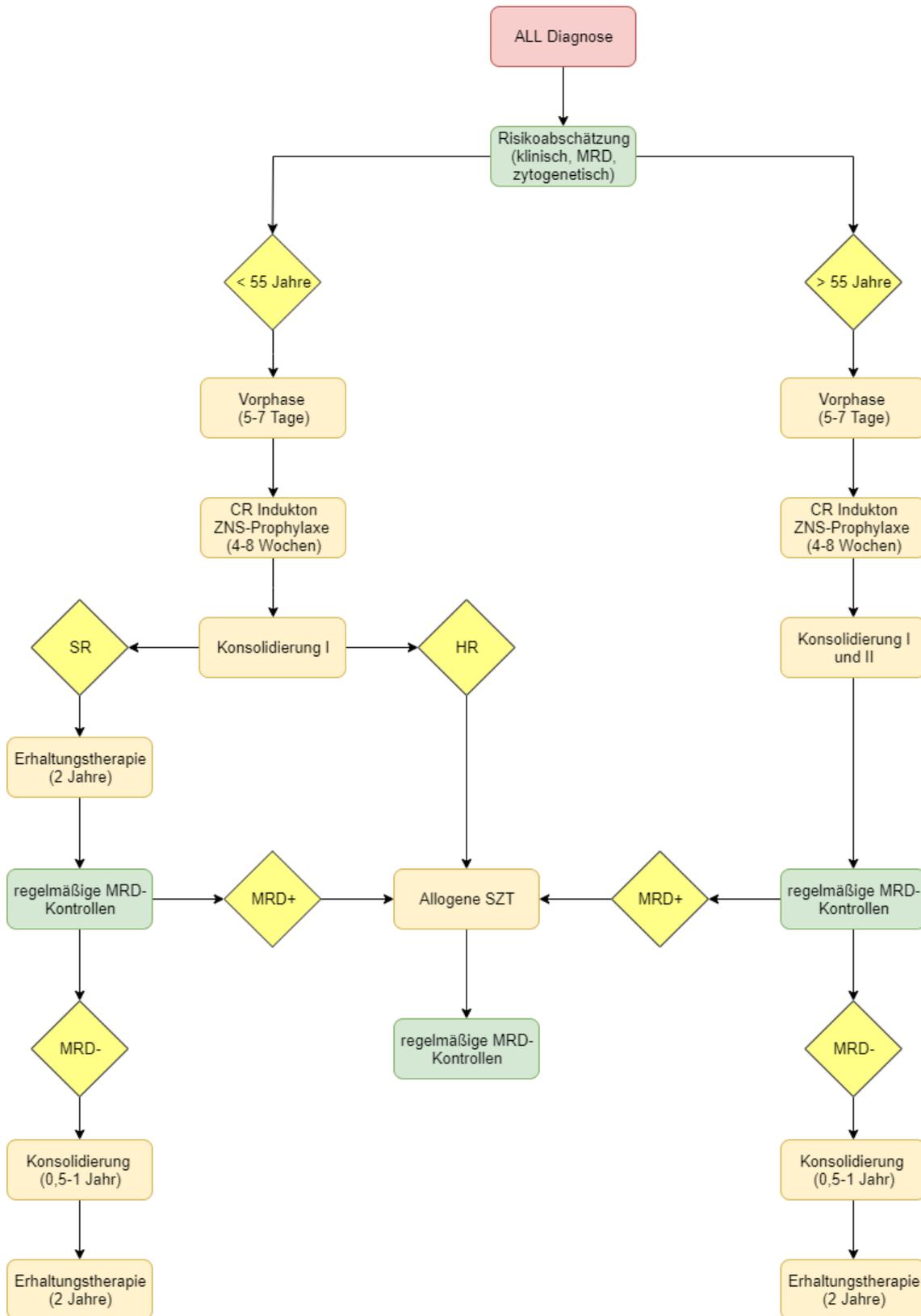
mittels Immunphänotypisierung sowie zytogenetischer und molekulargenetischer Verfahren genauer charakterisiert werden.<sup>42,68</sup> Zu Therapiebeginn und an bestimmten Zeitpunkten (Tag 26 und Tag 46 im Therapieverlauf<sup>69</sup>) wird aus dem Knochenmarksblut die *minimale Resterkrankung* (MRD) bestimmt, um eine Risikoeinschätzung vorzunehmen und das Therapieansprechen zu beobachten.<sup>70</sup> Zur Standarddiagnostik der ALL zählt außerdem eine Liquorpunktion um einen ZNS-Befall auszuschließen bzw. festzustellen.<sup>10</sup>



**Abbildung 7: Ausstrich von Knochenmarksblut von einem Patienten mit ALL** Es zeigen sich multiple lymphatische Blasten. Die Abbildung ist entnommen aus Nair *et al.*<sup>71</sup>

#### 1.2.4 Therapie

In den letzten 30 Jahren gab es große therapeutische Fortschritte, sodass bei erkrankten Kindern Heilungsraten von 80 bis 90 % erreicht werden konnten.<sup>72,73</sup> Mädchen zeigen insgesamt ein längeres ereignisfreies Überleben (*event-free survival*) als Jungen.<sup>74</sup> Erwachsene weisen eine schlechtere Prognose als Kinder auf: 2014 lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Erwachsenen in Deutschland nur bei 43 %.<sup>75</sup> 2017 beschrieb die *ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up* jedoch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50-70 % für erwachsene Patienten mit Standardrisiko. Auch bei Hochrisikopatienten sei sie auf ca. 50 % angestiegen, wenn diese eine allogene Stammzelltransplantation erhielten. Des Weiteren konnte auch bei Patienten über 55 bzw. 60 Jahren das Outcome durch weniger invasive Therapien verbessert werden: Todesraten sanken auf 15 %, die durchschnittliche Überlebenszeit stieg auf 33 Monate.<sup>68</sup>



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Risikoabschätzung und Therapie bei ALL**  
 Legende: MRD = minimale Resterkkrankung (*Minimal Residual Disease*); MRD+/- = MRD (nicht) vorhanden; SR = Standardrisiko (*standard risk*); HR = hohes Risiko (*high risk*). Die Abbildung ist modifiziert nach Hoelzer D et al.<sup>68</sup> und Gökbuget et al.<sup>48</sup>

Die Risikostratifizierung bei ALL erfolgt anhand prognostischer Faktoren: Für eine ungünstige Prognose sprechen ein Auftreten von mehr als 100.000 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$ , chromosomale Abberationen (z.B. Hypoploidie), ein Alter unter 1 Jahr oder über 10 Jahren, initial schlechtes Ansprechen auf Steroide und eine hohe MRD.<sup>46,76,77</sup> Weitere prognostisch ungünstige Chromosomenabberationen (wie BCR-ABL1-Translokationen) sind unter 1.2.2 beschrieben. Die Children's Oncology Group teilt die Patienten anhand dieser Faktoren in *very-high-risk*-, *high-risk*-, *standard-risk*- und *low-risk*-ALL ein.<sup>78</sup>

Der Therapiealgorithmus bei ALL nach erfolgter Risikostratifizierung ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Grundprinzipien der ALL-Therapie sind Einleitung einer Remission, Verhinderung der ZNS-Infiltration und Aufrechterhaltung der Remission durch eine Erhaltungstherapie.<sup>46</sup> Bei der Behandlung von ALL werden Therapieempfehlungen beachtet, die von sogenannten Studiengruppen etabliert worden sind. Die folgenden Angaben entstammen der deutschen Studiengruppe GMALL:

Die Gesamtdauer der Behandlung von ALL (ohne Erhaltungstherapie) entspricht etwa einem Jahr. Bei der Behandlung pädiatrischer Patienten unterscheidet man Vorphase, Induktionstherapie, Reinduktionstherapie, Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie.<sup>69</sup> Insbesondere die Therapie junger Erwachsener ähnelt derer von Kindern, jedoch werden die Schemata an das jeweilige Patientenalter angepasst. So werden bei älteren Patienten weniger intensive Therapieprotokolle verwendet und auf Antrazykline und Alkylanzien verzichtet, um die Mortalitätsrate zu senken.<sup>68</sup>

Die Vorphase wird mit Prednisolon und Cyclophosphamid eingeleitet um einem Tumorlysesyndrom vorzubeugen. Außerdem werden während der Vorphase notwendige diagnostische Untersuchungen wie die Bestimmung der BCR-ABL-Status und die Lumbalpunktion durchgeführt.<sup>48</sup>

Es folgt eine vierwöchige Induktionstherapie, deren Ziel es ist, mehr als 99 % der Blasten abzutöten und die Patienten somit in eine klinische Remission (CR) zu bringen. Im Protokoll nach der GMALL 2002-Studie lässt sich die Induktionsphase nochmals in drei Blöcke (A bis C) einteilen. Verwendete

Chemotherapeutika sind Prednisolon, Vincristin, L-Asparaginase und gegebenenfalls Daunorubicin. Das GMALL 07/2003-Studienprotokoll unterscheidet die Induktionsphasen I und II.<sup>46,69</sup> Nach der Induktionsphase I erfolgt eine Knochenmarkspunktion zur MRD-Bestimmung. In der Induktionsphase II werden weitere Medikamente wie Cyclophosphamid und Mercaptopurin sowie eine intrathekale Methotrexat-Prophylaxe gegeben<sup>48</sup> um einen Befall des Nervensystems zu verhindern.<sup>79</sup>

Nun schließt sich die Konsolidierung an, die der Rezidivprophylaxe dient und eine längerfristige Remission bewirken soll. Verwendete Chemotherapeutika sind Methotrexat, Vindesin und Cytarabin. Gegebenenfalls erfolgt an den Tagen 2 und 16 die Gabe von pegylierter Asparaginase.<sup>69</sup> Bei Hochrisiko-Patienten führt die allogene Stammzelltransplantation im Vergleich zur Hochdosischemotherapie zu einer besseren Prognose.<sup>80</sup> Anschließend kann eine Reinduktion mit den in der Induktionstherapie verwendeten Medikamenten erfolgen.<sup>48</sup>

Die Erhaltungstherapie wird nach GMALL 07/2003 mit Methotrexat und Mercaptopurin durchgeführt.<sup>46,69</sup> Sie sollte mindestens 2 Jahre andauern um Rezidive zu vermeiden.<sup>74</sup>

1971 wurde die Notwendigkeit einer zusätzlichen ZNS-Prophylaxe mittels kranialer Bestrahlung oder intrathekalem MTX bestätigt.<sup>82</sup> Die Schädelbestrahlung findet meistens an Tag 26 und Tag 46 der Behandlung statt.<sup>69</sup> 2009 stellten Pui *et al.* in einer klinischen Studie fest, dass die ZNS-schädigende Schädelbestrahlung bei Kindern in der Therapie ausgelassen werden kann.<sup>83</sup> Patienten mit BCR-ABL-Translokationen werden zusätzlich gezielt mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor wie beispielsweise Imatinib behandelt.<sup>84</sup> Auch Patienten mit Ph-like-ALL, welche ähnliche Gene exprimieren wie Ph+-Patienten, jedoch keine BCR-ABL1-Umlagerung aufweisen, erhalten eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren.<sup>86</sup>

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt, der insbesondere bei Rezidiven oder refraktären Verläufen zum Einsatz kommt, ist die Verwendung monoklonaler Antikörper. Der gegen den B-Zell-Oberflächenmarker CD20 gerichtete Antikörper Rituximab zeigt bei reifzelliger B-ALL Erfolg.<sup>68</sup> Patienten mit refraktärer B-ALL können erfolgreich mit Blinatumomab behandelt werden. Dieses weist Antikörper

gegen CD19 und gegen CD3 auf und ruft somit eine T-Zell-abhängige Lyse der B-Zellen hervor.<sup>87</sup> Außerdem können die T-Zellen eines Patienten derartig verändert werden, dass sie einen *chimeric antigen receptor* (CAR) exprimieren. Diese Zellen richten sich ebenfalls gegen CD19 der B-Zellen und können somit bei B-ALL-Rezidiven eingesetzt werden. Dieses Verfahren wird als CAR-T-Zelltherapie bezeichnet.<sup>88,89</sup>

### 1.2.5 Prä-B-Zell-ALL

Eine ALL, die von Prä-B-Zellen ausgeht, wurde 1978 erstmalig von Vogler *et al.* beschrieben.<sup>90</sup> Diese Erkrankung wird als Prä-B-Zell-ALL bezeichnet<sup>91</sup> und macht 15 % der malignen Erkrankungen im Kindesalter aus.<sup>92</sup>

Prä-B-Zell-Leukämien sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert, da die durchschnittlichen Remissionszeiten kürzer sind und das Nervensystem sowie das Knochenmark früher von der Erkrankung betroffen sind.<sup>93</sup> Die 4-Jahre-Ereignis-freies-Überleben-Rate betrug 63 % in einer Studie aus dem Jahre 1989. Dabei zeigten Kinder mit Pro-B-Zell-ALL längere Remissionszeiten als Kinder mit Prä-B-Zell-ALL.<sup>94</sup>

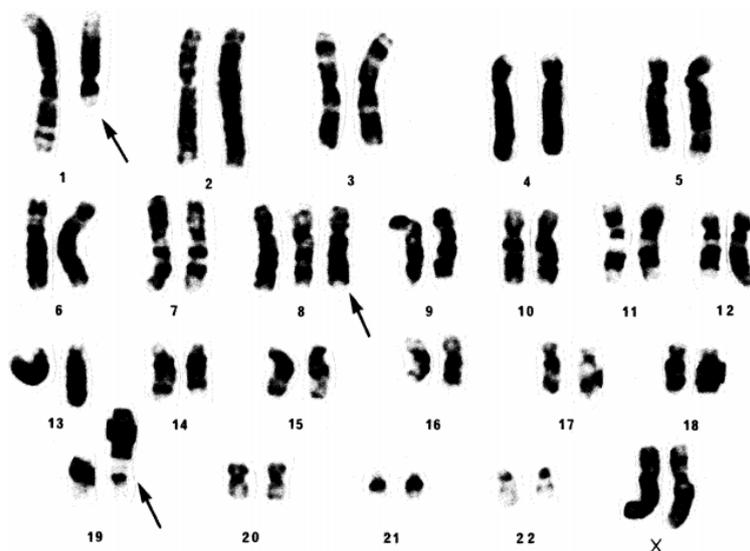
Bei Prä-B-ALL wird die Proliferation der Zellen gefördert, indem die Aktivierung von PI3K und Janus-Kinase durch eine vermehrte IL-7-Stimulation gesteigert wird. Diese Kinasen aktivieren wiederum den Transkriptionsfaktor STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*),<sup>95</sup> der die Proliferation der Zellen vorantreibt.<sup>96</sup> Außerdem wird die BCL-6-Expression durch Mutationen, welche zu einer Inaktivierung von BLNK führen, vermindert. Dadurch wird der Zellzyklus vorangetrieben. Darüber hinaus kann der RAS-ERK-Signalweg durch verstärkende Mutationen von RAS oder der *SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2* (SHP2) vermehrt aktiviert werden.<sup>25</sup> Eine wichtige Rolle spielt das BCR-ABL-Fusionsprotein, indem es durch Bindung an das Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2* den RAS- und PI3K-Signalweg aktiviert.<sup>97</sup>

## 1.3 RCH-ACV

RCH-ACV sind Prä-B-Zellen, welche in den 1980er Jahren von einem Mädchen mit Vorläufer-B-Zell-Leukämie isoliert worden sind.<sup>98</sup> Diese Zellen tragen eine

Chromosomentranslokation – t(1;19)(q23;q13) – zwischen Chromosom 1 und Chromosom 19<sup>99</sup>, was zur Bildung eines Fusionsproteins der Transkriptionsfaktoren E2A und Pbx1 führt.<sup>100</sup> Diese Translokation findet sich in 23 % der Prä-B-ALL.<sup>99</sup> Sie ist für die Leukämieentstehung bedeutsam, da durch die Koppelung der Transaktivierungsstelle des E2As mit Pbx1 (*Pre-B-cell leukemia transcription factor 1*) viele *homeobox-* (HOX-)/Pbx1-Zielgene abgelesen werden, welche bei Überexpression als Onkogen wirken. Dies hat unkontrollierte Zellteilungen zur Folge.<sup>101</sup> Das E2A-Pbx1-Fusionsprotein wird in RCH-ACV dreimal so stark exprimiert wie in der Zelllinie 697, die die gleiche Chromosomentranslokation aufweist.<sup>102</sup> Außerdem tritt bei RCH-ACV eine Trisomie des Chromosoms 8 auf.<sup>98</sup>

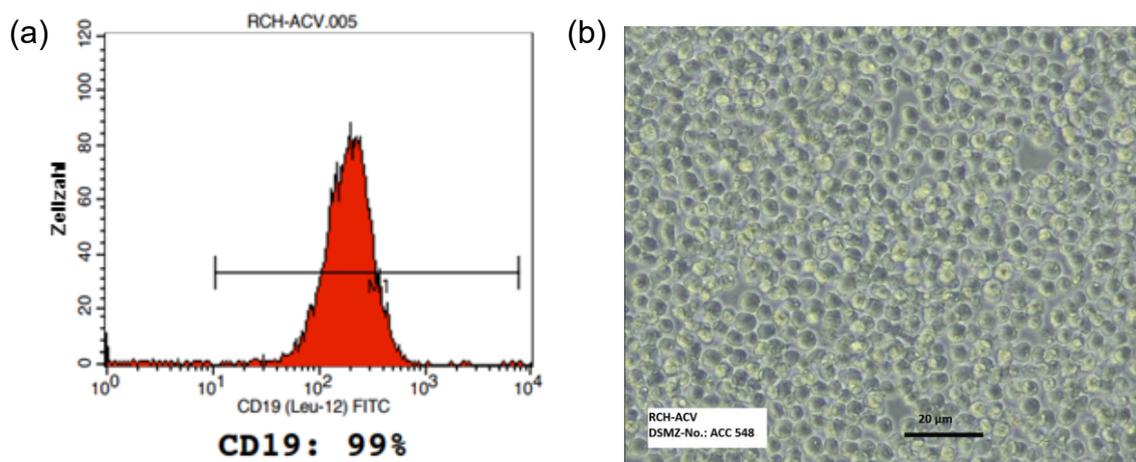
In Abbildung 9 ist das Karyogramm der RCH-ACV dargestellt.



**Abbildung 9: Karyogramm bei RCH-ACV** Es zeigt sich eine Translokation zwischen Chromosom 1 und 19 sowie eine Trisomie von Chromosom 8. Die Abbildung ist modifiziert nach Jack *et al.*<sup>98</sup>

Wie in Abbildung 10a mittels Durchflusszytometrie gezeigt, sind RCH-ACV wie alle B-Zellen CD19 positiv. Außerdem tragen sie den ubiquitär bei allen Prä-B-Zellen vorkommenden Oberflächenmarker IgM. Darüber hinaus exprimieren sie den Marker CD79a, der einen Teil des BZRs darstellt, und den MHC-Klasse-II-Oberflächenmarker HLA-DR. Des Weiteren sind sie positiv für CD138 (Syndecan)<sup>103</sup>, welches ein transmembranäres Proteoglykan darstellt, das eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung und Zellverbindung spielt.<sup>104</sup>

RCH-ACV lassen sich am besten in 80-90 % RPMI 1640 mit 10-20 % h.i. fetalem Kälberserum (FBS) anzüchten. Sie haben eine Verdopplungszeit von 30-50 Stunden und sollten in einer Dichte von ca.  $0.5$  bis  $2.5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Kultur gehalten werden. Es handelt sich um kleine runde Zellen, die einzeln oder gelegentlich in kleinen Gruppen in Suspension wachsen. In Abbildung 10b ist eine mikroskopische Aufnahme der Zellen gezeigt. RCH-ACV tragen keine Virus-Antigene des Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B- oder Hepatitis C-Virus oder von HIV. Sie sind der Risikogruppe 1 der biologischen Schutzstufe zuzuordnen.<sup>103</sup>



**Abbildung 10: Charakterisierung der RCH-ACV-Zellen (a) Durchflusszytometrische Charakterisierung** Die Zellen sind CD19 positiv. **(b) Mikroskopische Darstellung** Die runden, kleinen Zellen wachsen einzeln in Suspension. Die Abbildungen sind entnommen vom Leibniz Institut DSMZ.<sup>103</sup>

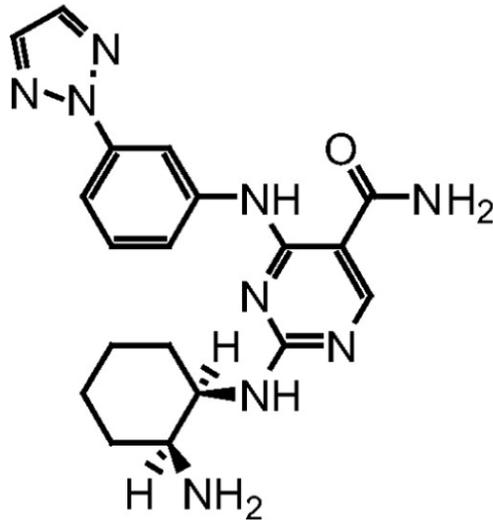
#### 1.4 Untersuchung von Proteinen *downstream* im BZR-Signalweg

Wie bereits bei 1.1.3.2 beschrieben, handelt es sich bei SYK um eine Kinase, die bereits sehr weit *upstream* eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung des BZR spielt. So ist außerdem beschrieben, dass dieser Signalweg mittels SYK-Inhibition reguliert werden kann.<sup>105</sup>

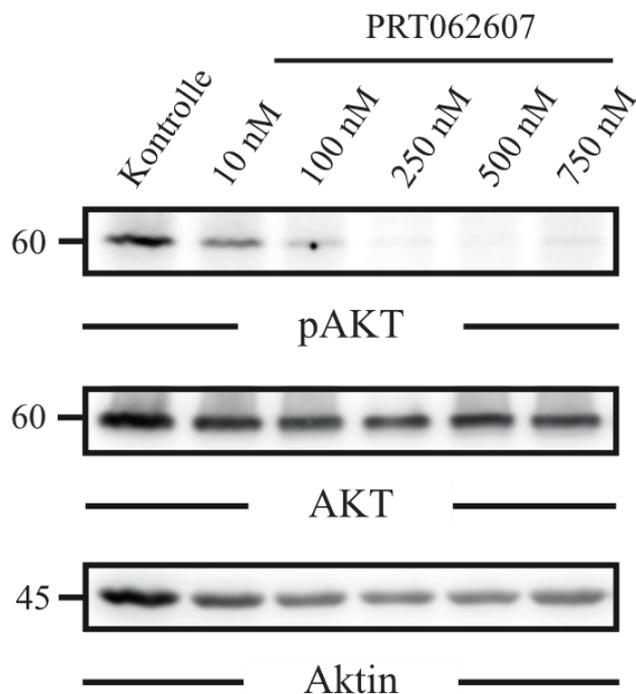
Dieses Phänomen konnte in unserer Arbeitsgruppe auch in den Prä-B-Zellen RCH-ACV bestätigt werden: Auf eine SYK-Inhibition reagieren RCH-ACV mit einer Abnahme der Phosphorylierung von AKT. Die Strukturformel des bei diesem Experiment verwendeten SYK-Inhibitors PRT062607 ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die Ergebnisse des beschriebenen Western Blot zeigt Abbildung 12. Es wurden folgende Konzentrationen des SYK-Inhibitors verwendet: 100 nM, 250 nM,

500 nM, 750 nM und 1.000 nM. Als Kontrolle wurden RCH-ACV anstatt mit dem Inhibitor mit dem gleichen Volumen an DMSO behandelt. Die SYK-Inhibition bewirkt eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von AKT. Eine Konzentration ab 250 nM führt dabei zu einem kompletten Verlust von pAKT.

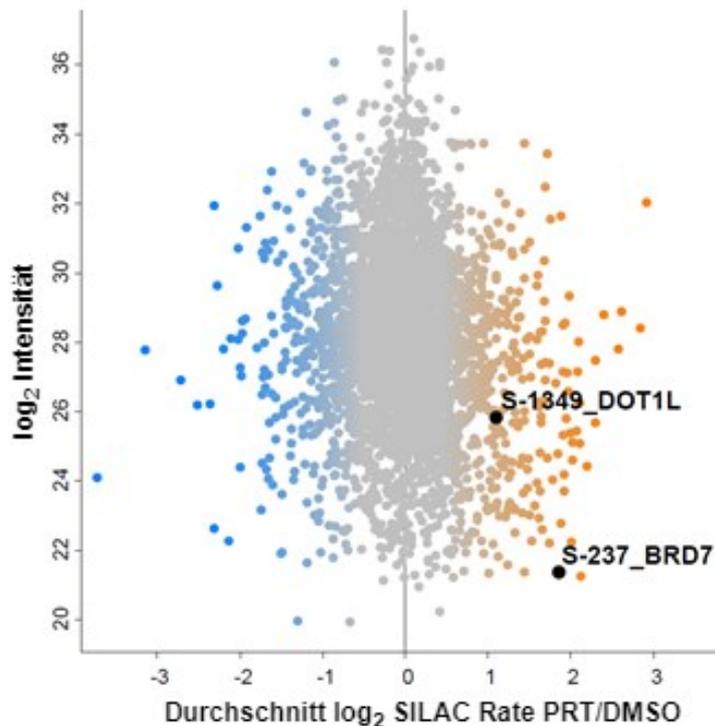


**Abbildung 11: Strukturformel des SYK-Inhibitors PRT062607** Die Abbildung ist entnommen aus Coffey *et al.*<sup>107</sup>



**Abbildung 12: Immunologische Darstellung von pAKT nach SYK-Inhibition** Die Zellen wurden für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen des SYK-Inhibitors PRT062607 behandelt. Das Experiment wurde von Dr. Roland Walter durchgeführt.

Darüber hinaus zeigten massenspektrometrische Experimente, dass es im Rahmen der SYK-Inhibition auch zu einer Regulation des Phosphorylierungszustandes der *downstream* im BZR-Signalweg vorkommenden Effektormoleküle DOT1L und BRD7 kommt. Die Ergebnisse des globalen Phosphoproteoms sind in Abbildung 13 visualisiert.



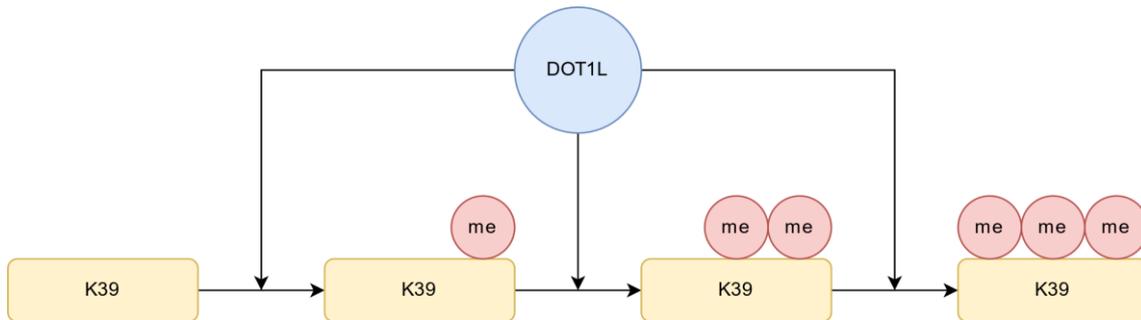
**Abbildung 13: Globales Phosphoproteom (gPome) von RCH-ACV nach 1 h SYK-Inhibition**  
 Es sind die durch die SYK-Inhibition regulierten Proteine dargestellt. Rechts in der Abbildung sieht man in *orangener Farbe* die positiv regulierten Proteine; links in *blauer Farbe* die negativ regulierten. BRD7 und DOT1L werden durch SYK-Inhibition phosphoryliert. Die Serinreste, an denen die Phosphorylierung stattfindet, sind ebenfalls angegeben. Der Versuch wurde von Dr. Khouloud Kouidri durchgeführt.

#### 1.4.1 DOT1L

DOT1L wurde als „*disruptor of telomeric silencing*“ in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt.<sup>108</sup> Es handelt sich um eine Histonmethyltransferase, die beim Menschen vor allem in den Hoden und im Knochenmark vorkommt und Mono-, Di- oder Trimethylierung von Histon H3 durchführen kann.<sup>109</sup> Die Funktion von DOT1L ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

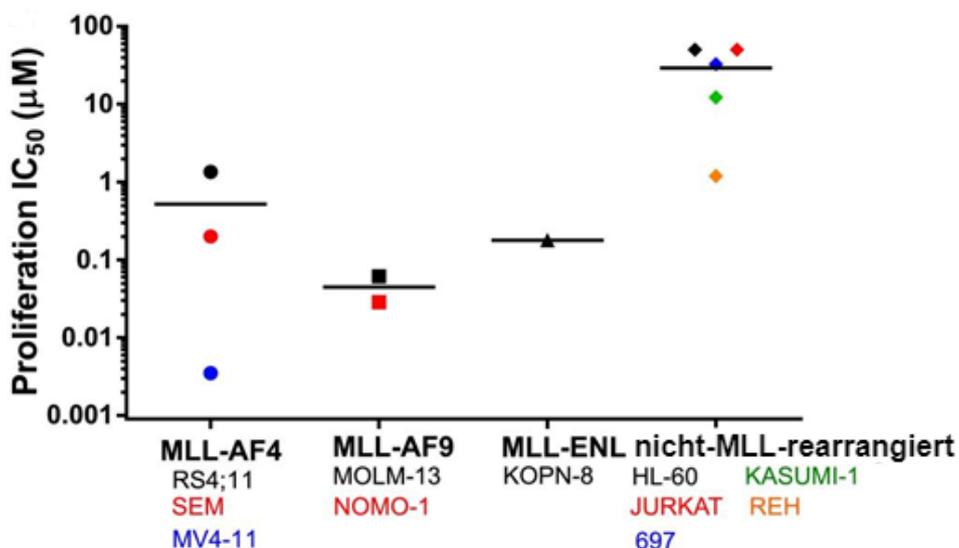
In der Literatur ist bereits beschrieben worden, dass DOT1L eine bedeutsame Rolle bei vielen zellulären Prozessen spielt: 2005 zeigte Shanower die Wichtigkeit der durch DOT1L-modulierten Methylierung von Histonen während

der Embryonalentwicklung von Fliegen.<sup>110</sup> 2008 konnte Ooga diesen Aspekt auch bei Mäusen bestätigen.<sup>111</sup> Jones *et al.* zeigten mithilfe der Klonierung von Knockout-Mäusen die Notwendigkeit von DOT1L für das Embryonalwachstum und für kardiale Funktionen: DOT1L-Knockdown-Mäuse zeigten vaskuläre Deformitäten des Dottersacks und eine Dilatation des Herzens. Außerdem war bei DOT1L-defizienten embryonalen Stammzellen die Telomer-Verkürzung gestört und es traten Zellen mit Aneuploidie auf.<sup>112</sup>



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktion von DOT1L** DOT1L führt zu Mono-, Di- oder Trimethylierung („me“) des Lysins an Stelle 39 von Histon H3. Die Abbildung ist modifiziert nach Kim *et al.*<sup>113</sup>

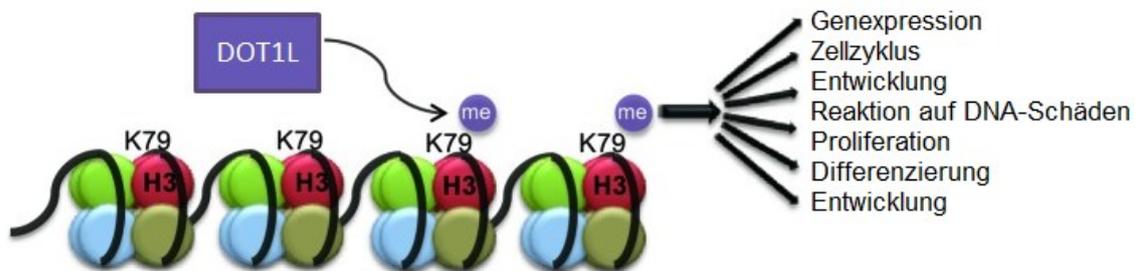
Des Weiteren ist in der Literatur die Interaktion von DOT1L mit AF10, einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von *Mixed-lineage*-Leukämien (siehe 1.2.2) spielt, bereits gezeigt worden.<sup>114</sup> Auch die apoptotische Wirkung der DOT1L-Inhibition ist in MLL-rekombinierten Zellen bereits beschrieben worden (siehe Abbildung 15).<sup>115</sup>



**Abbildung 15: Darstellung der IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Zelllinien, die 14 Tage mit dem DOT1L-Inhibitor EPZ5676 behandelt wurden** Die Zelllinien sind nach der Art ihrer MLL-Translokation in Gruppen eingeordnet worden. Die horizontalen Linien geben den durchschnittlichen IC<sub>50</sub>-Wert der Gruppe an. Die Abbildung ist modifiziert nach Daigle *et al.*<sup>115</sup>

Darüber hinaus konnte die Bedeutung von DOT1L für die embryonale Erythropoese und Myelopoese gezeigt werden: DOT1L reguliert die Transkription der Transkriptionsfaktoren GATA2 und PU.1. GATA2 fördert die frühe Erythropoese, während PU.1 die Myelopoese induziert.<sup>116</sup> Durch eine Herunterregulation von DOT1L mittels siRNAs wird die Proliferation von Lungenkarzinomzellen gehemmt, da die Segregation der Chromosomen in der Mitose gestört wird.<sup>117</sup> De Vos beschreibt DOT1L als einen „Timer“ für den Alterungsprozess von Zellen, da sich in alternden Zellen die Methylierung der Histone anhäuft.<sup>118</sup>

In Abbildung 16 sind einige Funktionen von DOT1L zusammengefasst.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionen von DOT1L** Die Methylierung von Histon H3 hat vielfältige zelluläre Wirkungen zur Folge. Die Abbildung ist modifiziert nach Kim *et al.*<sup>113</sup>

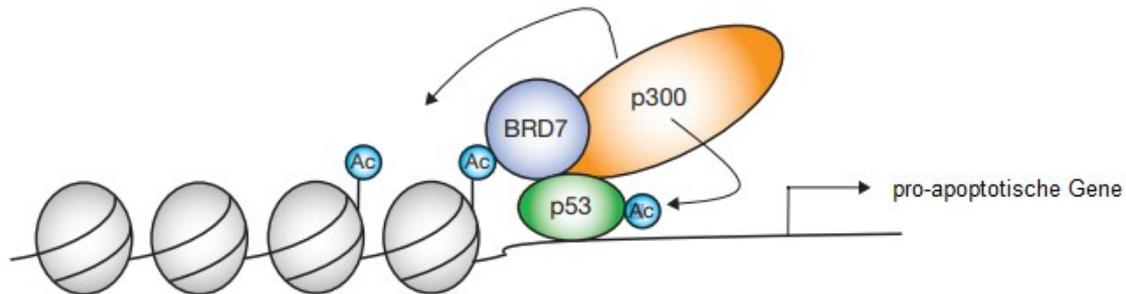
Nun soll untersucht werden, ob auch Prä-B-Zellen von DOT1L abhängig sind und dieses somit als therapeutischer Ansatzpunkt bei Prä-B-Zell-ALL dienen könnte.

#### 1.4.2 BRD7

Das Regulatorprotein BRD7 stellt einen Tumorsuppressor dar und enthält eine Bromodomain-Sequenz. Bei dieser Struktur handelt es sich um ein Proteinmotiv, welches 1992 erstmalig von Tamkun beschrieben wurde.<sup>119</sup> Es bindet spezifisch an acetylierte Lysine, welche sich N-terminal an Histonen befinden.<sup>120</sup> Die Bromodomain-Struktur besitzt eine Länge von etwa 60 Aminosäuren und ist in viele Transkriptionsprozesse involviert, die für die Entwicklung von Zellen notwendig sind.<sup>121</sup> Somit interagiert auch BRD7 mit vielfältigen Effektormolekülen, was im Folgenden verdeutlicht werden soll:

BRD7 kommt beim Menschen ubiquitär in allen Geweben vor, wird jedoch vor allem in den Hoden und in der Milz exprimiert. Es interagiert mit dem

Tumorsuppressor p53 und ist für die Transkription von p53-Zielgenen – wie beispielsweise p21 und HDM2 (humane Form des *Mouse double minute 2 homologs*) – erforderlich. Somit verhindert BRD7 das Wachstum einiger Tumorzellen, indem es die Seneszenz der Zellen fördert.<sup>122</sup> In Abbildung 17 ist die Funktion von BRD7 auf molekularer Ebene schematisch dargestellt.

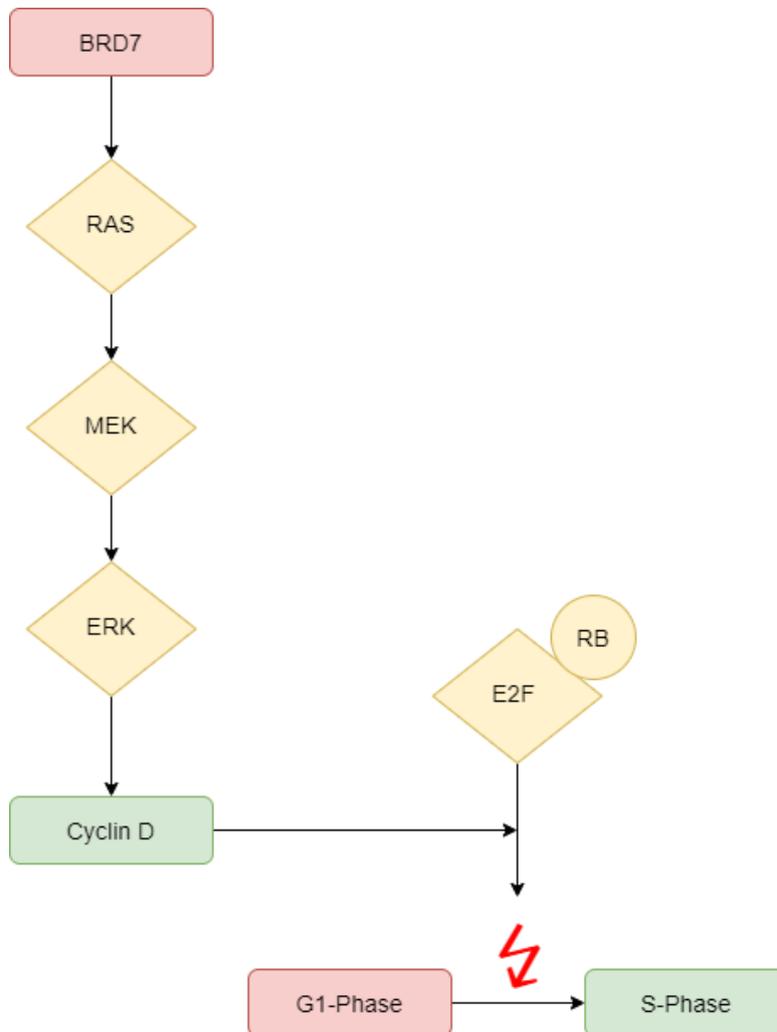


**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Funktion von BRD7** BRD7 fördert die Transkription pro-apoptischer Gene durch Bindung der Histon-Methyltransferase p300 an den p21-Promotor und damit die c-terminale Acetylierung von p53. Die Abbildung ist modifiziert nach Drost *et al.*<sup>122</sup>

Außerdem ist BRD7 Bestandteil des SWI/SNF-Chromatin-Remodelling-Komplexes, welcher die Transkription vieler Effektoren in embryonalen Stammzellen positiv oder negativ beeinflusst. Beispielsweise wird die Expression des *thyroid releasing hormones* (TRH) gefördert, während die Transkription der extrazellulären Protease ADAMTS1 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1*), welche bei der kardialen Entwicklung eine Rolle spielt, gehemmt wird.<sup>123</sup>

In der Literatur ist beschrieben, dass BRD7 das Zellwachstum hemmt, indem es im Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase blockiert.<sup>124</sup> Dies kann durch Interaktion mit dem *Interferon Regulatory Faktor 2*<sup>125</sup> oder durch Regulation der Transkription von Proteinen des ERK- bzw. Rb (Retinoblastom-Protein)/E2F-Signalwegs<sup>124</sup> geschehen, was schematisch in Abbildung 18 dargestellt ist. Darüber hinaus verstärkt BRD7 den Wnt-Signalweg, welcher eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation spielt, indem es die Proteinkinase GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase-3 beta*) inaktiviert.<sup>126</sup> Des Weiteren ist BRD7 relevant bei der Infektion von Zellen mit dem Adenovirus, da es einen Komplex mit Histonen sowie mit dem Transkriptionsregulator E1BAP5 bildet, welcher in viral infizierten Zellen die DNA-Replikation sowie den Transport von mRNA fördert.<sup>127</sup>

In vielen verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise bei Brustkrebs<sup>128</sup>, Nasopharynxkarzinom<sup>129</sup> und Kolorektalem Karzinom<sup>130</sup> ist eine Herunterregulation von BRD7 bereits beschrieben worden. Beim Nasopharynxkarzinom induziert eine Überexpression von BRD7 die Apoptose in den Zellen durch die Inhibition des ERK-/Ras-Signalwegs.<sup>131</sup>

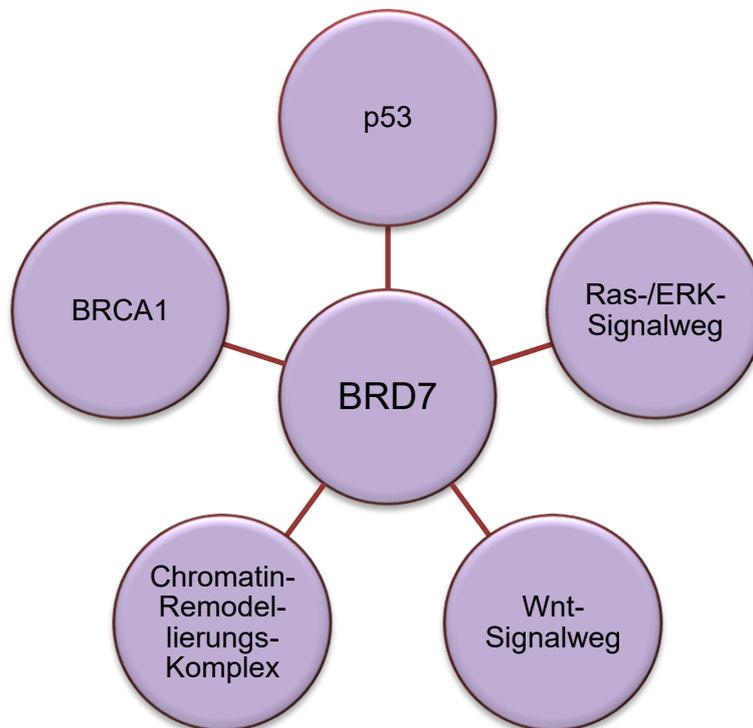


**Abbildung 18: BRD7 blockiert den Übergang von der G1- in die S-Phase** BRD7 reguliert die Expression der Proteine des Ras/ERK- und des Rb/E2F-Signalwegs, was zu einer verminderten Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Rb führt. Dieses bewirkt anschließend die Blockade des Zellzyklus. Die Abbildung ist modifiziert nach Zhou *et al.*<sup>124</sup>

Eine direkte Interaktion von BRD7 mit dem Tumorsuppressorgen BRCA1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*), welches bei der Pathogenese von Mammakarzinomen eine wichtige Rolle spielt, ist in der Literatur bereits beschrieben worden.<sup>128</sup> Auch bei der Pathogenese von Osteosarkomen ist BRD7 von Bedeutung. Niedrigere BRD7-Level korrelieren hierbei mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung.<sup>132</sup> Außerdem führt ein Knockdown von BRD7 zu

vielfältigen Defekten in der Spermatogenese und dadurch zur Infertilität des Mannes.<sup>133</sup>

In B-Zellen ist die Rolle von BRD7 noch nicht umfassend studiert worden: Es ist beschrieben, dass BRD7 in Mantelzell-Lymphom- und Leukämie-Zellen – verglichen mit reifen B-Zellen – vermehrt mit ST7- und RBL2-Promotoren interagiert.<sup>134</sup> ST7 (*suppressor of tumorigenicity 7*) wirkt vermutlich als Tumorsuppressor; *Retinoblastoma-like-protein-2* spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und Epigenetik.<sup>135</sup> Außerdem ist BRD7 an der Herunterregulation von Zielgenen von PRMT5 und PRC2 beteiligt.<sup>134</sup> Die Methyltransferase PRMT5 (*Protein arginine N-methyltransferase 5*) stellt einen wichtigen Regulator des Zellwachstums dar und wird in einigen Tumorentitäten überexprimiert.<sup>136</sup> Die Histonmethyltransferase PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) ist bedeutsam für die Differenzierung von Zellen. Mutationen von PRC2 wurden bereits in vielfältigen Tumorentitäten beschrieben.<sup>138</sup> In Abbildung 19 sind einige Interaktionspartner von BRD7 dargestellt.



**Abbildung 19: Einige Interaktionspartner von BRD7** BRD7 interagiert u.a. mit dem Chromatin-Remodeling-Komplex und den Tumorsuppressoren p53 und BRCA1. Außerdem sind Interaktionen mit dem Ras-/ERK-Signalweg sowie dem Wnt-Signalweg beschrieben. Die Abbildung ist modifiziert nach Yu *et al.*<sup>131</sup>

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll die Rolle von BRD7 in Prä-B-Zellen genauer charakterisiert werden und daraus gewonnene Erkenntnisse bei der Frage nach therapeutischen Ansatzpunkten bei B-ALL diskutiert werden.

## 2 Zielsetzung

Die Störung der B-Zellreifung stellt den Ursprung vieler maligner Erkrankungen dar. Eine Entartung auf der Entwicklungsstufe der Prä-B-Zellen führt hierbei zur Entstehung der Prä-B-ALL. Die Prä-B-ALL macht 15 % der malignen Erkrankungen im Kindesalter aus und ist mit einer schlechten Prognose mit kurzen Remissionszeiten assoziiert. Daher stellt die Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien ein relevantes Ziel aktueller Leukämie-Forschung dar. Um neue therapeutische Ansatzpunkte aufzudecken ist ein tiefergehendes Verständnis der Signalwege in Prä-B-ALL-Zellen notwendig. Ausgangspunkt dieser Signalwege ist der Prä-B-Zellrezeptor, der in der normalen Hämatopoese einen wichtigen Kontrollpunkt bei der B-Zellreifung darstellt. Relevante Signalwege, die *downstream* des Prä-BZRs lokalisiert sind und deren Regulation sich in anderen Tumorentitäten bereits als bedeutsam für Zellproliferation und Apoptose gezeigt hatten, sind der MAPK- sowie PI3K-Signalweg.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden die B-Vorläuferzellen RCH-ACV verwendet, die die Chromosomentranslokation  $t(1;19)(q23;q13)$  tragen, welche in etwa 23 % aller Prä-B-ALL-Zellen auftritt. Um neue therapeutische Optionen für Prä-B-ALL zu analysieren, sollen diese Zellen genauer charakterisiert werden, indem ihre Abhängigkeit von dem MAPK- und dem PI3K-Signalweg studiert wird.

Vorversuche zeigten, dass es sich bei BRD7 und DOT1L um zwei Effektoren *downstream* im Prä-BZR-Signalweg handelt, die durch SYK-Inhibition in ihrem Aktivitätsniveau reguliert werden. Während diese beiden Proteine in anderen Tumorentitäten bereits untersucht worden sind, sind sie in Prä-B-Zellen noch nicht umfassend studiert worden. Ich stelle somit die Hypothese auf, dass die Modifikation dieser beiden Effektorproteine einen Einfluss auf die Proliferation und Apoptose von Leukämiezellen hat und dass sie daher als Ansatzpunkte bei der Therapie von Prä-B-ALL dienen können.

Ziel meiner Dissertationsarbeit ist es, die Bedeutung von DOT1L und BRD7 bei der Prä-B-Zell-ALL besser zu verstehen. Durch die Untersuchung der Abhängigkeit der RCH-ACV von verschiedenen Signalwegen kann die Relevanz einer Expressionsänderung für das Zellüberleben eingeschätzt werden. Insgesamt sollen dadurch tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen der

Signalwege, welche vom Prä-BZR ausgehen, ermöglicht werden und gegebenenfalls neue therapeutische Ansatzpunkte für die Prä-B-ALL aufgezeigt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Eigenname	Hersteller
Abbildungssystem	Odyssey® Fc	LI-COR, Lincoln (USA)
Autoklav	Varioklav	H & P Labortechnik, Oberschleißheim
	VX-150	Systec, Linden
Bakterieninkubator	Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bunsenbrenner	Labogaz 206	Campingaz, Hungen
Digitalwaage	Universal	Satorius, München
Durchflusszytometer	BD FACS Fortessa™	BD Bioscience, Heidelberg
	BD FACS Aria™ III	BD Bioscience, Heidelberg
Echt-Zeit PCR Instrument	StepOne™ Real- Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ein-Kanal-Pipette	Eppendorf Xplorer®	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Feinwaage		Mettler Toledo, Gießen
Gefrierschrank	-20 °C: Comfort, Profi line	Liebherr, Biberach
	-80 °C	New Brunswick, Wesseling- Berzdorf
Kühlschrank	Premium	Liebherr, Biberach
Massenspektrometer	Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupol- Orbitrap	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Magnetrührer	RCT Basic 2	IKA® Labortechnik, Staufen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Eigenname</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
	CK2	Olympus, Tokio
Mikrovolumen-Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Multitrotator	PTR-35	Grant-bio, Cambridgeshire
pH-Meter	ph522	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
		Gilson, Limburg-Offheim
Reaktionsgefäßrüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York
Reaktionsgefäßroller	RM5	CAT, Ballrechten-Dottingen
Spannungsgerät	PowerPac™ Basic	BioRad, München
	PeqPower	Peqlab (jetzt VWR), Erlangen
Sterile Werkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
	Lamin Air	Holten
		BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Stickstofftank	MVE 1500 Series-190	Chart, Garfield Heights (USA)
Thermozykler	T100™ Thermal Cycler	BioRad, München
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Burgwedel
Wasserdeionierungsanlage	Milli-Q	Millipore (jetzt Merck Millipore), Massachusetts
Western Blot-Wippe	ST5	Ingenieurbüro CAT, Ballrechten-Dottingen

Bezeichnung	Eigenname	Hersteller
Zellzählgerät	TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Zellzählkammer	Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zellkulturinkubator	HeraCell 240i, Hera Cell 150i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
	Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
	Rotina R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
	Centrifuge 5427 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	Sigma 1-14	Sigma, Kanagawa

Tabelle 3: Verwendete Geräte

### 3.1.2 Allgemeine Labormaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienkulturröhrchen 14 ml <i>polypropylene round bottom tube</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einfrierboxen	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gefäße für Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Glasröhrchen	Schott, Mainz; Brand, Wertheim
Nitrozellulose Membran Trans Blot <i>Transfer Medium Puro Nitrocellulose Membran, 0,45 µM</i>	BioRad, München
Papier für Western Blotting	Sartorius, Göttingen
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettierhelfer <i>Pipetboy acu 2</i>	Integra Biosciences, Biebertal

Bezeichnung	Hersteller
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße: 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Western Blot Kammern	Bio-Rad, München
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	Costar GmbH, Bodenheim Greiner bio-one, Frickenhausen Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellzähl-Objektträger <i>Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual-Chamber</i>	Biorad, München

Tabelle 4: Allgemeine Labormaterialien

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
2-Propanolol	Sigma-Aldrich	33539
Acrylamid-Lösung, 30 %	Panreac Applichem	A3626,0500
Albumin Fraktion V (pH 7,0) für Western blotting	Applichem	A6588,0100
Ampicillin-Natriumsalz	Applichem	A0839,0025
APS	Thermo Fisher Scientific	17874
BCA Protein Assay Reagent A/Reagent B	Thermo Scientific	23224
$\beta$ -Mercaptoethanol	Applichem	A1108,0025
cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11484100
DMSO	Applichem	A3672,0100
Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich	D9891

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
DPBS	Gibco Life Technologies	14190-094
Ethanol absolute 99,8 %	Sigma-Aldrich	2410
Fast SYBR® Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific	4385612
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Qiagen	239901
HBSS	Sigma-Aldrich	H9269
HDGreen® Safe DNA Dye	Intas	ISII-HDGreen Plus
Laemmli Sample Buffer, 4x	Bio-Rad	161-0747
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth	X965.1
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth	X964.1
Marker Precision Plus Dual All Blue Standards	Biorad	1610373
Marker Precision Plus Dual Color Standards	Biorad	1610374
Methanol	Sigma-Aldrich	32213-M
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth	T145.2
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Riedel de Haen	13412
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Applichem	A2196,0005
Natriumpyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	Thermo Fisher Scientific	11360070
NP-40 (10 % in H <sub>2</sub> O)	BioVision	2111-100
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set	Thermo Fisher Scientific	23208
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific	32106
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz	sc-2003
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	P8833
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen	79306

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific	15544-034
SDS	Applichem	A1112
Silac RPMI-Medium	Thermo Fisher Scientific	88421
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34096
T4 DNA Ligase	New England BioLabs	M0202S
T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 10x	New England BioLabs	B0202S
TEMED	Roth	2367.1
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth	9090.3
Tris/Glycine Buffer, 10x	Bio-Rad	161-0771
Tris/Glycine/SDS Buffer, 10x	Bio-Rad	161-0772
Trypanblau Lsg. 0,4 %	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin	Promega	V5111
Tween® 20 BioChemica	AppliChem	A1389,0500
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific	10977-049
Universal-Agarose	Peqlab	35-1020

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

### 3.1.3.1 Restriktionsenzyme und -puffer

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
BamHI-HF	New England BioLabs	R3136S
BsiWI	New England BioLabs	R0553S
CutSmart™ Buffer, 10x	New England BioLabs	B7204S
EcoRI	New England BioLabs	R0101S
Fast Digest Buffer, 10x	Thermo Fisher Scientific	B64

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Mlul FD	Thermo Fisher Scientific	FD0564
Xhol	New England BioLabs	R0146S

**Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme und -puffer**

### 3.1.4 Puffer und Gelmedien

Puffer	Zusammensetzung
10 x Annexin V-Bindungspuffer, pH 7,4	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl <sub>2</sub>
5 % Sammelgel	5,45 mL H <sub>2</sub> O 1,7 mL 30 % Acrylamid 2,5 mL Sammelgel-Puffer (s. unten) 125 µL 10 % APS 12,5 µL TEMED
8 % Trenngel	7,1 mL H <sub>2</sub> O 4 mL 30 % Acrylamid 3,75 mL Trenngel-Puffer (s. unten) 150 µL 10 % APS 6 µL TEMED
FACS-Puffer	94 % PBS 2 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS 2 % (v/v) Pen/Strep
Modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) NP-40 0,1 % (w/v) Na-deoxycholate 1x Protease Inhibitor Cocktail 5 mM β-Glycerophosphat 5 mM NaF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 10 mM N-Ethylmaleinimid

Puffer	Zusammensetzung
NP-40-Zellysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM NaF 0,5 % (v/v) NP-40 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1x Protease Inhibitor Cocktail 0,5 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS pH 8,8
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS pH 6,8
TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS-Tween	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 2,5 mM KCl 0,1 % (v/v) Tween-20
Tris-SDS-Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,52 2 % SDS/Glycerol

**Tabelle 7: Verwendete Puffer und Gelmedien**

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primäre Antikörper für den Western Blot

Die verwendeten primären Antikörper wurden im angegebenen Verdünnungsverhältnis in TBS-Tween-Lösung mit 5 % BSA (Bovines Serumalbumin) gelöst und bei 4 °C gelagert.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
AKT (pan)	Kaninchen	Cell Signaling	4691S	mono	1:1.000
Beta-Actin	Maus	Cell Signaling	3700S	mono	1:3.000

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
BRD7 (D9K2T)	Kaninchen	Cell Signaling	15125	mono	1:1.000
BTK	Kaninchen	Cell Signaling	8547S	mono	1:1.000
H3 dimethyl K79	Kaninchen	Abcam	ab3594	poly	1:1.000
Histon H3	Kaninchen	Abcam	ab1791	poly	1:50.000
p44/42 MAPK (ERK)	Kaninchen	Cell Signaling	4695S	mono	1:1.000
pAKT	Kaninchen	Cell Signaling	4060S	mono	1:1.000
pBLNK	Kaninchen	Cell Signaling	3601S	poly	1:1.000
pBTK	Kaninchen	Cell Signaling	5082S	poly	1:1.000
PI3K p85 $\alpha$ B9	Maus	Santa Cruz	sc-1637	mono	1:1.000
PI3K p85 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ D9	Maus	Santa Cruz	sc-374534	mono	1:1.000
p-p44/42 MAPK	Kaninchen	Cell Signaling	4370S	mono	1:1.000
pSYK	Kaninchen	Cell Signaling	2711S	mono	1:1.000
Tubulin	Kaninchen	Cell Signaling	2146S	poly	1:1.000

**Tabelle 8: Primäre Antikörper für den Western Blot**

### 3.1.5.2 Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Die sekundären Antikörper F(ab')<sub>2</sub> anti-Kaninchen-IgG und F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus-IgG wurden im angegebenen Verhältnis in reiner TBS-Tween-Lösung gelöst und nach Gebrauch verworfen.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
F(ab') <sub>2</sub> anti-Kaninchen-IgG, HRPO-gekoppelt	Ziege	Dianova	111-036-003	poly	1:7.500

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
F(ab') <sub>2</sub> anti-Maus-IgG, HRPO-gekoppelt	Ziege	Dianova	115-035-146	poly	1:7.500

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für den Western Blot

### 3.1.5.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Hersteller	Produktnummer
7-AAD	BD Pharmingen	559925
PE Annexin V	BD Pharmingen	556421

Tabelle 10: Antikörper für die Durchflusszytometrie

### 3.1.5.4 Antikörper für die Immunpräzipitation

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
BRD7 B8	Kaninchen	Cell Signaling	SC-376180	mono	1:100
Flag	Kaninchen	Sigma Aldrich	F7425	poly	1:100
HA High Affinity	Ratte	Sigma Aldrich	3F10	mono	1:100
Isotype control	Kaninchen	Cell Signaling	3900S	mono	1:100
PI3K p85	Kaninchen	Cell Signaling	4257S	mono	1:17

Tabelle 11: Antikörper für die Immunpräzipitation

### 3.1.5.5 Sonstige Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Prod.nr.	Klonalität	Verd.
F(ab') <sub>2</sub> anti-human-IgM	Ziege	Jackson Immuno Research	109-006-129	poly	1:100

Tabelle 12: Sonstige Antikörper

### 3.1.6 Inhibitoren

Bezeichnung	Gerichtet gegen	Hersteller	Produktnummer
EPZ004777	DOT1L	SelleckChem	S7353
EPZ5676 (Pinometostat)	DOT1L	SelleckChem	S7062
GSK1120212 (Trametinib)	MEK	SelleckChem	S2673
LY294002	PI3K	SelleckChem	S1105
PRT062607	SYK	SelleckChem	S8032

Tabelle 13: Verwendete Inhibitoren

### 3.1.7 Oligonukleotide

#### 3.1.7.1 Plasmide

Um die Rolle von BRD7 in RCH-ACV zu untersuchen, wurden die Zellen zum einen mittels viraler Vektoren transduziert, die eine Überexpression von BRD7 hervorrufen, zum anderen mittels Vektoren, die für einen BRD7-Knockdown kodieren. Der pLentiCRISPRv2-Vektor wurde für die Klonierung einer durch Tetrazykline induzierbaren BRD7-Überexpression benötigt.

Plasmid	Quelle/Hersteller
LT3-GECIR	Fellmann et al. <sup>139</sup>
LT3-GEPIR	Fellmann et al. <sup>139</sup>
MSCV N-term HA-FLAG puro BRD7	Addgene (#41934)
pLentiCRISPRv2	Addgene (#52961)

Tabelle 14: Verwendete Plasmide

#### 3.1.7.1.1 LT3-GECIR-Vektor

Der LT3-GECIR-Vektor wurde zur Klonierung einer induzierbaren BRD7-Überexpression verwendet. Dabei handelt es sich um einen sogenannten *Tet*-

ON *all-in-one* Vektor, der durch Tetracycline induzierbar ist. Er enthält den konstitutiv exprimierenden Promotor PGK, der zur Ableitung des Fluoreszenzgens mCherry führt. An dieses ist der Transaktivator 3 (rtTA3) über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt. Der durch Doxycyclin induzierbare Promotor T3G ist an den Fluoreszenzmarker GFP sowie an eine shRNA gekoppelt. An die Stelle der shRNA wurde der für die BRD7-Überexpression kodierende DNA-Abschnitt einkloniert. Nach Induktion mit Doxycyclin wird somit zusätzlich zur BRD7-Überexpression GFP exprimiert. Der Aufbau des Vektors ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der für die Klonierung bedeutsamen Bestandteile des verwendeten GECIR-Vektors** Der konstitutiv exprimierende Promotor PGK (*hellblau*) führt zum Ablesen des Fluoreszenzgens mCherry (*rot*). Der durch Doxycyclin induzierbare Promotor T3G (*braun*) ist an den Fluoreszenzmarker GFP (*grün*) sowie an eine shRNA (*dunkelblau*) gekoppelt. An die Stelle der shRNA wurde der für die BRD7-Überexpression kodierende DNA-Abschnitt einkloniert. Der Vektor wurde freundlicherweise von J. Zuber, IMP, Wien zur Verfügung gestellt.

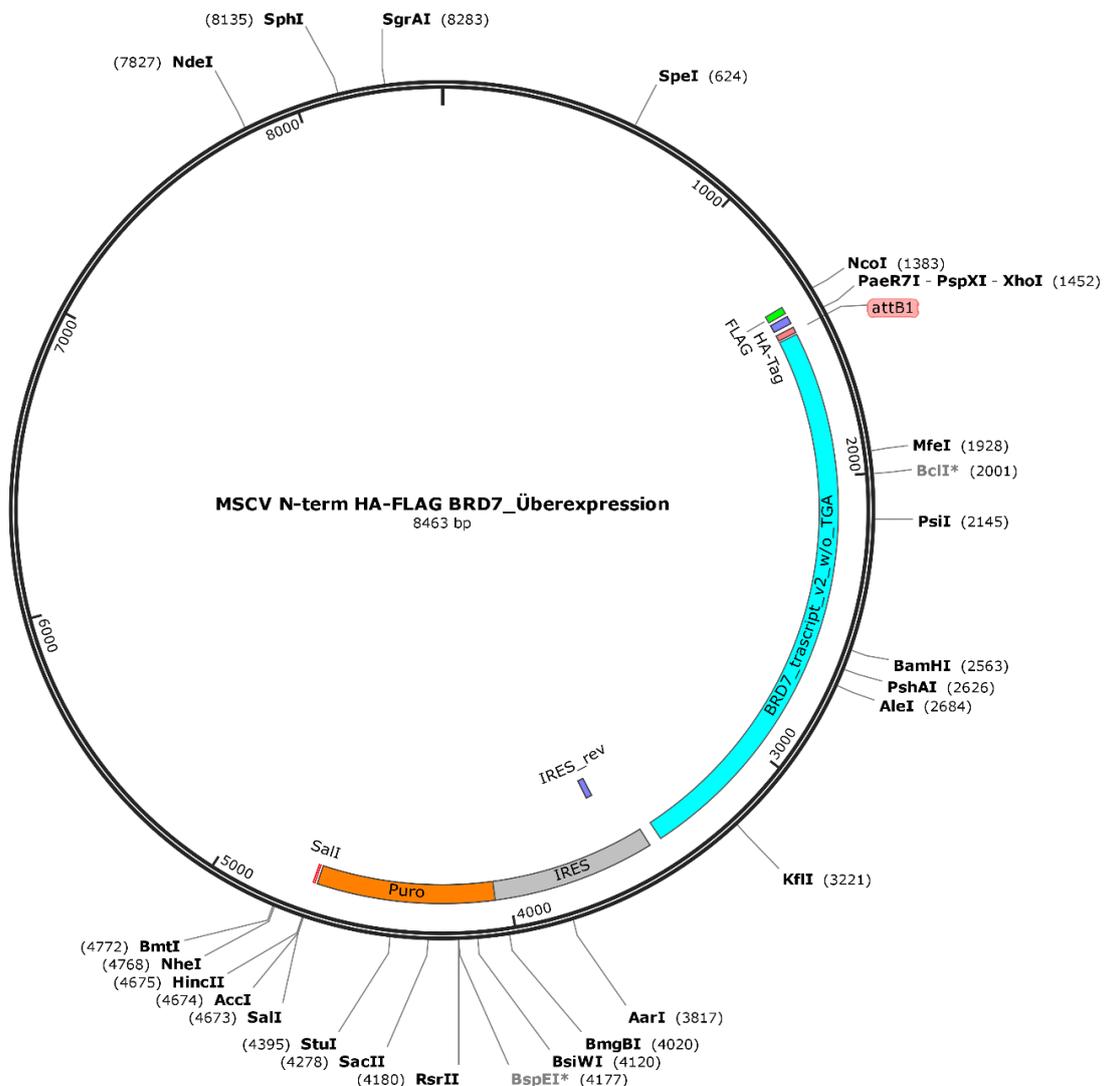
### 3.1.7.1.2 LT3-GEPIR-Vektor

Der LT3-GEPIR-Vektor wurde zur Klonierung eines BRD7-Knockdowns verwendet. Dabei handelt es sich – wie bei dem bei 3.1.7.1.1 beschriebenen LT3-GECIR-Vektor – um einen sogenannten *Tet-ON all-in-one* Vektor, der durch Tetracycline induzierbar ist. Der Vektor enthält den konstitutiv exprimierenden Promotor PGK, der zur Ableitung der Puromycin-Resistenz führt. An diese ist der Transaktivator 3 (rtTA3) über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt. Der durch Doxycyclin induzierbare Promotor T3G ist an den Fluoreszenzmarker GFP sowie an eine shRNA gekoppelt. Nach Induktion mit Doxycyclin wird die shRNA abgelesen, die für den Knockdown von BRD7 kodiert. Gleichzeitig kommt es zur Expression von GFP, was man bei der Analyse der Zellen nutzen kann. Die für die Klonierung bedeutsamen Bestandteile des Vektors sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der für die Klonierung bedeutsamen Bestandteile des verwendeten GEPIR-Vektors** Der konstitutiv exprimierende Promotor PGK (*hellblau*) führt zum Ablesen der Puromycin-Resistenz (*dunkelblau*). Der durch Doxycyclin induzierbare Promotor T3G ist an den Fluoreszenzmarker GFP (*grün*) sowie an eine shRNA (*dunkelblau*) gekoppelt. An diese Stelle wurde die shRNA einkloniert, die für den Knockdown von BRD7 kodiert. Der Vektor wurde freundlicherweise von J. Zuber, IMP, Wien zur Verfügung gestellt.

### 3.1.7.1.3 MSCV N-term HA-FLAG puro BRD7



**Abbildung 22: Darstellung der Bestandteile des Vektors MSCV N-term HA-FLAG puro BRD7** Der Vektor exprimiert konstitutiv die BRD7-Überexpression (*hellblau*). Außerdem enthält er einen HA-Tag (*lila*), einen FLAG-Tag (*grün*) und eine Puromycin-Resistenz (*orange*). Die Plasmidkarte wurde mithilfe des Programms *SnapGene* angefertigt.

Zur Analyse der Effekte einer konstitutiven BRD7-Überexpression wurde ein Vektor von *Addgene* erworben, der die BRD7-Sequenz bereits enthielt und sie konstitutiv exprimierte. Außerdem enthielt der Vektor einen HA-Tag, einen FLAG-Tag und eine Puromycin-Resistenz.

In Abbildung 22 ist der Vektor als Plasmidkarte dargestellt. Er besitzt eine Länge von 8463 bp. Seine Bestandteile sind in unterschiedlichen Farben markiert und die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind außen um die Plasmidkarte angegeben. Als Kontrollzellen für die Experimente mit diesem Vektor wurden RCH-ACV-Wildtyp-Zellen verwendet.

### 3.1.7.2 shRNAs

#### 3.1.7.2.1 shRNAs zur Klonierung eines Knockdowns von BRD7

Es wurden zwei shRNA-Sequenzen verwendet, die für einen Knockdown von BRD7 kodieren (LT3-GECIR\_ BRD7.732 und LT3-GECIR\_ BRD7.2253). Diese werden der Übersichtlichkeit halber im Folgenden als shBRD7\_Sequenz 1 (Seq1) und shBRD7\_Sequenz 2 (Seq2) bezeichnet.

Die Oligonukleotide entstammen der Firma *Sigma-Aldrich*.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
LT3-GECIR_ shBRD7.732 (Seq1)	TGCTGTTGACAGTGAGCGCTCAGTCCATAGAAGA AAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTAGTTCTTCTATGG ACTGATTGCCTACTGCCTCGGA
LT3-GECIR_ shBRD7.2253 (Seq2)	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGAGGTTGGACTTGTA TTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATAACAAGTCCAACC TCTGGATGCCTACTGCCTCGGA

Tabelle 15: shRNAs zur Klonierung eines Knockdowns von BRD7

#### 3.1.7.2.2 Unspezifische shRNAs als Kontrollsequenzen

Für die Klonierung von Kontroll-shRNA wurden zwei unspezifische shRNA-Sequenzen von der Firma *Sigma-Aldrich* verwendet (shGL2 und shNTC). Diese

wurden in den Experimenten als Kontrolle zu den shRNAs verwendet, die für einen Knockdown von BRD7 kodieren.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)	Zielsequenz (5' → 3'-Richtung)
LT3-GEPIR-shGL2	CTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACA GTGAGCGCCACGTACGCGGAATACT TCGATAGTGAAGCCACAGATGTATCG AAGTATTCCGCGTACGTGATGCCTAC TGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTC	TCACGTACGCG GAATACTTCGA
LT3-GEPIR-shNTC	CTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACA GTGAGCGCCCGGCTGAAGAGCCTGA TCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTG ATCAGGCTCTTCAGCCGGTTGCCTAC TGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTC	ACCGGCTGAAG AGCCTGATCAA

Tabelle 16: Unspezifische shRNAs als Kontrollsequenzen

### 3.1.7.3 Primer

Alle verwendeten Primer stammen von *Sigma-Aldrich*.

#### 3.1.7.3.1 Primer für die Klonierung eines Vektors für die induzierbare BRD7-Überexpression

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
BRD7_1_for_os	TGCGTTGGATCCGCCACCATGGGCAAGAAGCA CAAGAAG
BRD7_1_rev_i1as	CTGGCTCTCCTACAATGGGGTCCACAGGATGG AGAAGTCC
BRD7_2_for_i1s	GGAATTCTCCATCCTGTGGACCCCATGTAGGA GAGCCAG
BRD7_2_rev_i2as	CAGAGAGAAGTTTGTGCGCCACTTCCACCAG GTCCACAC
BRD7_P2A_for_i2s	GTGTGGACCTGGTGGAAAGTGGCGCAACAACT TCTCTCTG

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
BRD7_P2A_rev_oas	CATGGTGGATCCCGGTCCAGGATTCTCTTCG

Tabelle 17: Primer für die Klonierung eines Vektors für die induzierbare BRD7-Überexpression

### 3.1.7.3.2 Primer für die Klonierung der Vektoren mit BRD7-Knockdown

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
miRE_denovo_EcoR1_rev (TO-P-37)	TCTCGAATTCTAGCCCCTTGAAGTCCGA GGCAGTAGGC
miRE_denovo_Xho1_for (TO-P-36)	TGAACTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGA CAGTGAGCG

Tabelle 18: Primer für die Klonierung der Vektoren mit BRD7-Knockdown

### 3.1.7.3.3 Primer für die qPCR zur Bestätigung und Quantifizierung der BRD7-Überexpression

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
hActin_for	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
hActin_rev	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC
hBRD7_for	TGGAGATGTCATTGCCTGAAGA
hBRD7_rev	CCCTGGTGGCTCTACTTCTG

Tabelle 19: Primer für die qPCR zur Bestätigung und Quantifizierung der BRD7-Überexpression

### 3.1.7.3.4 Sequenzierprimer

Zur Bestätigung einer korrekten Klonierung führte die Firma *Seqlab* die Sequenzierungen der klonierten Plasmide durch. Dabei wurden die Primer *BRD7\_seq\_for* und *BRD7\_seq\_rev* bei der Klonierung der induzierbaren BRD7-Überexpression eingesetzt; *ZUB-SEQ-PR\_for* und *ZUB-SEQ-PR\_rev* wurden bei der Überprüfung der Klonierung von shRNAs in LT3-GEPIR verwendet.

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
BRD7_seq_for	AAGCACACGCCTTCAAGAGT

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
BRD7_seq_rev	ACGTCGTTGTTCCATCTGGT
ZUB-SEQ-PR_for	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTAC
ZUB-SEQ-PR rev (TO-P-121)	ATGCTCCAGACTGCCTT

Tabelle 20: Verwendete Sequenzierprimer

### 3.1.7.4 Linker-Peptide

Die Linker-Oligonukleotide wurden selbst designt und von *Sigma-Aldrich* erworben.

Bezeichnung	Oligo#	Nukleotidsequenz (5' → 3'-Richtung)
GECIR_Linkер_BsiWI_Mlul_as	8810298367-000020	CGCGTTACGTACCCCGATATCC
GECIR_Linkер_BsiWI_Mlul_s	8810298367-000010	GTACGGATATCGGGGTACGTAA

Tabelle 21: Verwendete Linker-Peptide

### 3.1.8 Verwendete Zelllinien

#### 3.1.8.1 Humane Zelllinien

In meiner Dissertationsarbeit habe ich mich überwiegend mit den Prä-B-Zellen RCH-ACV beschäftigt. Die HEK293T werden benötigt, um Virusmoleküle zur Transduktion herzustellen (siehe 3.2.1.7). Die übrigen Zellen dienen als Kontrollzellen bei verschiedenen Experimenten.

Sofern nicht anders vermerkt, stammen alle Zelllinien vom *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*.

Zelllinie	Zellbank	Bestellnummer
A375	ATCC	CRL-1619
Daudi	DSMZ	ACC 78

Zelllinie	Zellbank	Bestellnummer
HEK293T	DSMZ	ACC 635
MV4-11	DSMZ	ACC 102
RCH-ACV	DSMZ	ACC 548
SMS-SB	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jan A. Burger vom <i>MD Anderson Cancer Center</i>	-

Tabelle 22: Verwendete humane Zelllinien

### 3.1.8.2 Bakterielle Zellen

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
kompetente E. coli	New England BioLabs	#C2987H

Tabelle 23: Verwendete bakterielle Zellen

### 3.1.9 Zellkulturmedien und -zusätze

Medium	Hersteller	Produktnummer
DMEM	Gibco Life Technologies	41965-062
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific	21875-034

Tabelle 24: Verwendete Zellkulturmedien

Zusatz	Hersteller	Produktnummer
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich	F7524
Dialysiertes fetales Kälberserum (dFKS) Lot BS182266.5B	Bio&Sell	FCS.DIA.0500
L-Arginin	Sigma-Aldrich	A5006
L-Arginin: HCL (13C6, 99 %; 15N4, 99 %)	Eurisotop	CNLM-539-H1

Zusatz	Hersteller	Produktnummer
L-Lysin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	L5751
L-Lysin: 2HCL (13C6, 99 %; 15N2, 99 %)	Eurisotop	CNLM-291-H1
L-Prolin	Carl Roth	1713.2
L-Glutamin, 200mM, 100x	Gibco Life Technologies	25030-123
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco Life Technologies	15140122

Tabelle 25: Verwendete Zellkulturmedienzusätze

### 3.1.9.1 Zusammensetzung verschiedener Medien

Zellkulturmedium für	Zusammensetzung
A375	DMEM Medium 10 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfrieren der Zellen	90 % hitzeinaktiviertes FKS 10 % (v/v) DMSO
HEK293T	DMEM Medium 10 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 % Natriumpyruvat
Massenspektrometrie	Silac RPMI Medium 10 % hitzeinaktiviertes dFKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 200 µg/ml L-Prolin 0,25 mM L-Arginin ( <i>Light</i> ) bzw. 0,25 mM L-Arginin +10 ( <i>Heavy</i> ) 0,6 mM L-Lysin ( <i>Light</i> ) bzw. 0,6 mM L-Lysin +8 ( <i>Heavy</i> )

Zellkulturmedium für	Zusammensetzung
RCH-ACV, MV4-11, Daudi	RPMI 1640 Medium 10 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
SMS-SB	RPMI 1640 Medium 15 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 26: Zusammensetzung verschiedener Medien

### 3.1.10 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific	K0503
Invitrogen™ Ambion™ TURBO DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1907
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific	78833
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel	740422.50
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28706
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
Quick Blunting™ Kit	New England BioLabs	E1201S
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	K1632

Tabelle 27: Verwendete kommerzielle Kits

### 3.1.11 Software

Bezeichnung	Entwickler
Adobe® Illustrator CS4	Adobe Inc.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Entwickler</b>
BD FACSDiva™ 8.0.1	BD (Becton, Dickinson and Company)
FlowJo® V10	FlowJo LLC
GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	Wayne Rasband
Odyssey® Fc	LI-COR Biosciences
SnapGene	GSL Biotech LLC

**Tabelle 28: Verwendete Software**

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden pro Kryokonserven etwa  $1 \cdot 10^7$  Zellen in Reaktionsgefäße à 15 ml überführt und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium gelöst. Um eine langsame und konstante Temperaturabsenkung zu gewährleisten, wurden die Kryokonserven in Einfrierboxen überführt. Diese waren mit Isopropanol gefüllt und bewirkten eine Temperaturabsenkung von etwa 1 °C pro Minute. Nach 2 Tagen Lagerung bei -80 °C konnten die Zellen in den -80 °C-Gefrierschrank oder in den Stickstofftank überführt werden.

Um einen schonenden Auftauprozess zu gewährleisten, wurden die Zellen zügig bei 37 °C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Anschließend wurden sie 5 min bei 300 g zentrifugiert, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt. Nach 24 h wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### **3.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien**

Alle verwendeten Zellen wurden in Zellkultur-Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die RCH-ACV und die Daudi-Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet, indem 9/10 der Zellsuspension verworfen und der restliche Teil mit frischem, vorgewärmtem Medium aufgefüllt wurde.

Bei den SMS-SB und den MV4-11 erfolgte der Splitvorgang im Verhältnis 1:5.

Die adhärenenten Zellen HEK293T und A375 mussten zunächst vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst werden. Dazu wurde das Zellkulturmedium komplett abgenommen und die Zellen je nach Größe des Gefäßes mit einem entsprechenden Volumen an phosphatgepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden ein paar Milliliter Trypsin

zugegeben und die Zellen einige Minuten unter gelegentlichem Rütteln inkubiert, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Durch Zugabe der fünffachen Medienmenge konnte die Trypsinreaktion nun abgestoppt werden. Eine entsprechende Menge Zellsuspension wurde dann in ein neues Zellkulturgefäß überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

### **3.2.1.3 Zellzählung**

Zur Bestimmung eines Proliferationsnachteils der mit dem DOT1L-Inhibitor behandelten RCH-ACV wurden die Zellen sowie die Kontrollzellen in der gleichen Konzentration ausgesät. Es wurden jeweils  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen in einem Milliliter Medium aufgenommen und der Versuch 3-mal angesetzt. Alle 2 Tage wurden die Zellen gezählt. Nach jedem Zählvorgang wurden die Zellen gesplittet und wieder auf eine Zellzahl von  $0,75 \cdot 10^6$  eingestellt.

Sei  $G_x$  die Gesamtzellzahl an Tag  $x$ ,  $Z_x$  die gezählte Zahl an Tag  $x$  und  $S$  der Splitfaktor. Die Gesamtzellzahl berechnet sich dann wie folgt:

$$G_x = \frac{Z_x}{Z_{x-1} \cdot S} \cdot G_{x-1}, \quad \forall x > 0, \quad G_0 = Z_0$$

Die Bestimmung der Zellzahl konnte entweder mittels Zellzählgerät oder mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt werden. Pro Versuchsansatz wurde jeweils das gleiche Zählverfahren verwendet.

#### **3.2.1.3.1 Zellzählung mittels Zellzählgerät**

Bei der Zellzählung mittels Zellzählgerät wurden 10  $\mu$ l der zu zählenden Zellsuspension mit 10  $\mu$ l Trypanblau-Lösung gemischt und die Lösung auf die Zellzählplättchen gegeben. Das Zellzählgerät gab direkt den Zelltiter in Zellen pro Milliliter sowie die Viabilität der Zellen an.

#### **3.2.1.3.2 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer**

10  $\mu$ l der zu zählenden Zellsuspension wurden in ein Well einer 96-Well-Platte überführt und 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt. Bei sehr hohen Zellkonzentrationen wurde eine Verdünnung (beispielsweise 1:10) angesetzt. Nun wurde ein Deckgläschen auf eine Neubauer-Zählkammer gelegt und einige

Mikroliter der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die lebenden Zellen in den vier Eckquadraten gezählt.

Sei  $Z$  die Anzahl gezählter Zellen,  $K$  der Kammerfaktor und  $V$  der Verdünnungsfaktor, so berechnet sich der Zelltitel  $X$  in Zellen/ml wie folgt:

$$X = \frac{(Z \cdot K \cdot V)}{4}$$

Der Kammerfaktor betrug hier  $10^4$  /ml und dient dazu, vom Einschlussvolumen auf 1 ml zurückzurechnen. Der Verdünnungsfaktor betrug hier 2, da 10  $\mu$ l der Zellsuspension mit 10  $\mu$ l Trypanblau gemischt wurden.

#### **3.2.1.4 Stimulation des Prä-BZRs mit $\alpha$ -IgM und Behandlung der Zellen mit PI3K-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren**

Um die Abhängigkeit der RCH-ACV von dem PI3K-Signalweg sowie dem MEK-Signalweg zu untersuchen, wurden die Wildtypzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines PI3K-Inhibitors und eines MEK-Inhibitors behandelt.

Zusätzlich wurde eine Stimulation des Prä-BZRs mit  $\alpha$ -IgM durchgeführt, um den Einfluss der Inhibitoren auf einen aktivierten Rezeptor zu studieren. Der Anti-IgM-Antikörper löst dabei nach Bindung an den Rezeptor die Signaltransduktionskaskade aus.

##### **3.2.1.4.1 Stimulation des Prä-BZRs nach Behandlung der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002**

Der PI3K-Inhibitor LY294002 (S1105) wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Anschließend wurde folgende Titrationsreihe hergestellt:

100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1.000 nM

Der Inhibitor ist nicht spezifisch gegen die PI3K gerichtet, da er auch andere Kinasen wie die Casein Kinase 2 und die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) blockiert.<sup>140</sup>

Anschließend wurden etwa  $14 \cdot 10^6$  RCH-ACV-Zellen in 14 ml Medium in T25 Flaschen ausgesät und der Inhibitor im Verhältnis 1:1.000 zugegeben. Nach 1 h wurde eine Stimulation des Prä-BZRs der Zellen durchgeführt, indem sie

herunterzentrifugiert und in serumfreiem Medium aufgenommen wurden. Dann wurden sie auf jeweils 2 Gefäße à 1,5 ml aufgeteilt und 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eines der beiden Gefäße für 3 min mit  $\alpha$ -IgM (human) inkubiert und alle Zellen anschließend nach dem unten beschriebenen Protokoll (siehe 3.2.2.1) lysiert.

#### **3.2.1.4.2 Stimulation des Prä-BZRs nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor GSK1120212 (Trametinib)**

Der MEK-Inhibitor GSK1120212 (Trametinib) wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Anschließend wurde folgende Titrationsreihe hergestellt:

0,01 nM, 0,05 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM

Der Inhibitor ist sehr spezifisch für MEK, da er keine Inhibition von c-Raf, ERK1/2 sowie über 90 anderen getesteten Kinasen zeigt.<sup>141</sup>

Die Stimulation des Prä-BZRs und die Lyse der Zellen erfolgten wie bei 3.2.1.4.1 beschrieben.

#### **3.2.1.5 Behandlung der RCH-ACV mit DOT1L-Inhibitoren**

Um die Abhängigkeit der RCH-ACV von DOT1L zu untersuchen, wurden die Wildtypzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines DOT1L-Inhibitors behandelt.

Die beiden DOT1L-Inhibitoren EPZ004777 (#S7353) und EPZ5676 (Pinometostat, #S7062) wurden in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und die Aliquots bei -80 °C weggefroren. Aus jeweils einem der Aliquots wurde eine Titrationsreihe mit den folgenden Konzentrationen hergestellt:

10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1.000 nM

Die RCH-ACV wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6 \frac{1}{ml}$  ausgesät und die Inhibitoren in einem Verhältnis von 1:1.000 zugegeben. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurden als Kontrolle Zellen verwendet, zu denen DMSO ebenfalls im Verhältnis 1:1.000 zugegeben wurde. Anschließend wurden alle Zellen wie oben beschrieben kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Apoptose-Assays und Western Blots durchgeführt.

Als Kontrollzellen wurden MV4-11 mitgeführt und wie oben beschrieben behandelt.

### 3.2.1.6 Durchflusszytometrie

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität besitzen Zellen unterschiedliche Lichtstreuungseigenschaften und können anhand dieser charakterisiert werden.<sup>142</sup> Bei der Durchflusszytometrie nimmt die Größe Einfluss auf das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*), die Granularität auf das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*). Zusätzlich können Zellen analysiert werden, indem sie beim *Fluorescence-activated-cell-sorting* (FACS) mithilfe von Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen aussenden, angeregt werden. Dabei werden Reporterproteine, welche bei Anregung durch Laser fluoreszieren, an in die Zelle einzubringende Gene gekoppelt. Als Beispiel ist hierbei das *green fluorescent protein* (GFP) zu nennen.<sup>143</sup>

Das Einbringen von GFP kann durch verschiedene Varianten geschehen, wovon drei im Folgenden kurz charakterisiert werden sollen: Eine Fusion von GFP und Zielgen kann zum einen über die Einklonierung an Schnittstellen von Restriktionsenzymen<sup>144</sup> oder unter Verwendung von Verbindungspeptiden (*linker peptides*) geschaffen werden.<sup>145</sup> Außerdem kann die Expression des Reportergens über eine *internal ribosome entry site* (IRES) an das Zielgen gekoppelt werden. Dabei handelt es sich um Bereiche im Genom, welche unabhängig von ihrer 5'-Cap-Struktur intern die Translation initiieren können und so zum Ablesen beider Gene führen. Zumeist wird hierbei die zu transkribierende DNA vor der IRES eingefügt, das Reportergen dahinter.<sup>146</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von 2A-Sequenzen zwischen 2 Genen, da diese die Ausbildung der Peptidbindung inhibieren und somit zu einer cotranslationalen Teilung der beiden Proteine führen.<sup>147</sup> Bei den Experimenten, die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt wurden, wurden IRES und P2A-Sequenzen zur Kopplung von Reporter- und Zielgenen verwendet.

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen, welche GFP exprimieren, mit einem blauen Laser mit dem Filter B-530/30 angeregt werden. Dieser sendet Licht der Wellenlänge 488 nm aus.<sup>148</sup> Außerdem können Antikörperfärbungen durchgeführt werden, bei denen der Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff

(z.B. Phycoerythrin (PE)) gekoppelt ist. Während mithilfe des BD FACS Fortessa™ eine Analyse der Zellen möglich ist, bietet das BD FACS Aria III™ zusätzlich die Möglichkeit, Zellen mit gewünschten Eigenschaften (z.B. mCherry positiv und GFP positiv) in Echtzeit in verschiedene Probengefäße zu sortieren. Dabei wird ein Strahl aus einzelnen Tropfen geschaffen, indem jeder Tropfen genau eine Zelle enthält und diese somit einzeln analysiert und abgelenkt werden können. So können beispielsweise nur die transduzierten und induzierten Zellen wieder in Kultur genommen werden und mit diesen anschließend weitergearbeitet werden.

Die Analyse der von diesen beiden Durchflusszytometern gesammelten Daten erfolgte mithilfe der Software BD FACSDIVA™. Dabei wurden die Zellen in Echtzeit anhand von Streudiagrammen (*Scatter Plots*) dargestellt. Das Auswählen einer bestimmten Subpopulation der Zellen, entweder zur weiteren Analyse oder für den Sortiervorgang, wird als *Gating* bezeichnet. So werden beispielsweise im ersten Schritt mithilfe des *Forward* und des *Sideward Scatters* nur die lebenden, einzeln liegenden Zellen ausgewählt. Als Nächstes können dann weitere Eigenschaften wie die Anregbarkeit durch verschiedene Laser betrachtet werden. Manche der verwendeten Antikörperfärbungen ließen sich durch mehrere Laser anregen, da es einen Überlappungsbereich in ihrem Wellenlängenspektrum gab. In diesem Fall war eine „Kompensation“ notwendig, bei der dieser Aspekt von der Software herausgerechnet wurde, indem vorher das Ausmaß der Überlappung anhand von Einzelfärbungen ermittelt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software FlowJo® V10.

In dieser Dissertationsarbeit wurde zur BRD7-Überexpression ein Vektor verwendet, der konstitutiv mCherry und – nach Doxycyclin-Induktion – zusätzlich GFP exprimiert. Zellen, die das Reporter-gen mCherry exprimieren, können durch den gelbgrünen Laser mit dem Filter G-610/20 angeregt werden.<sup>148</sup> Für den Knockdown von BRD7 wurde ein Vektor verwendet, der GFP co-exprimiert und somit nach Induktion von dem Laser mit dem B-300/30-Filter angeregt werden kann.

### 3.2.1.6.1 Kompetitionsassays

Um die Wachstumsfähigkeit von gentechnisch veränderten Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen zu beurteilen, können Kompetitionsassays durchgeführt werden.

Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen im Verhältnis 1:1 mit Wildtypzellen gemischt und anschließend mit Doxycyclin induziert. An festgelegten Zeitpunkten wurde dann mittels Durchflusszytometrie die prozentuale Menge eines Reportergens im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Nimmt diese im Verlauf ab, spricht dies für einen Wachstumsnachteil der transduzierten Zellen gegenüber den Wildtypzellen.

Die Kompetitionsassays wurden mit RCH-ACV-Zellen durchgeführt, welche mit einem GEPIR-Vektor mit BRD7-Knockdown transduziert worden waren. Dieser Vektor kodiert neben dem Knockdown von BRD7 auch für das Fluorophor GFP. Nach Induktion kann somit der Anteil der shRNA exprimierenden Zellen mit dem blauen Laser mit dem Filter B-300/30 des BD FACS Fortessa™ bestimmt werden.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6 \frac{1}{ml}$  in einer 12-Well-Platte ausgesät und an Tag 0 mit 3 µg/µl Doxycyclin induziert. Die Messungen wurden alle 2 Tage durchgeführt. Bei den verwendeten Kontrollzellen handelt es sich um RCH-ACV-Zellen, welche mit einem GEPIR-Vektor mit der Kontrollsequenz shGL2 transduziert wurden. Bei jedem Mediumwechsel im Rahmen der Zellkultur wurde Doxycyclin wiederum zugegeben.

### 3.2.1.6.2 Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie

Lebende Zellen sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, bei der die Phospholipide asymmetrisch verteilt sind: Phosphatidylcholin und Sphingomyelin finden sich auf der Außenseite, während sich Phosphatidylserin auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht befindet. Werden Zellen durch proapoptotische Faktoren in die Apoptose getrieben, verlieren sie diese Asymmetrie ihrer Lipiddoppelschicht, da Phosphatidylserin nun auf die Außenseite umgelagert wird. An das Phosphatidylserin kann nun das Protein Annexin V binden, welches an den Farbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt wird und daher anschließend

mittels Durchflusszytometrie detektiert werden kann.<sup>149</sup> Der DNA-Interkalator 7-Aminoactinomycin (7-AAD) färbt nur abgestorbene Zellen an, da er die Zellmembran von lebenden Zellen nicht überwinden kann.<sup>150</sup> Bei dem hier beschriebenen Apoptose-Assay wurde eine Doppelfärbung mit PE-gekoppelten Annexin V und 7-AAD durchgeführt. Frühapoptotische Zellen reagieren positiv auf Annexin V und negativ auf 7-AAD, während (spät-) apoptotische Zellen von beiden Substanzen angefärbt werden.<sup>151</sup>

Zur Färbung wurden ca.  $5 \cdot 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen in jeweils 198  $\mu$ l Annexin V-Bindungspuffer + 2  $\mu$ l PE-gekoppeltem Annexin V-Antikörper aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C wurde 200  $\mu$ l Annexin V-Bindungspuffer zugegeben und die Proben wiederum abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 198  $\mu$ l Annexin V-Bindungspuffer + 2  $\mu$ l 7-AAD resuspendiert und 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Annexin V-Bindungspuffer wurde die Analyse mittels Durchflusszytometrie am BD FACS Fortessa™ durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mittels Laser mit den Filtern G582\_15 und B695\_40 angeregt und anschließend der Anteil der viablen Zellen mittels *Gating* auf die Annexin V- und 7-ADD-negativen Zellen bestimmt.

In dieser Dissertationsarbeit wurden Apoptose-Assays mit den BRD7-Überexpressionszellen sowie mit unterschiedlichen Wildtypzellen, die mit PI3K-, MEK- oder DOT1L-Inhibitoren behandelt wurden, durchgeführt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurden Kontrollzellen mitgezogen, die anstatt mit dem Inhibitor mit dem gleichen Volumen an DMSO inkubiert wurden. Der Viabilitätsanteil dieser Zellen wurden als Nullwert betrachtet und alle gemessenen Werte auf ihn normalisiert.

Zur Analyse der so gewonnenen Daten wurde die Software FlowJo® V10 verwendet, die Visualisierung erfolgte mittels *GraphPad Prism*.

### **3.2.1.7 Virale Transduktion**

Um Zellen auf DNA-Ebene zu modifizieren, existieren verschiedene Möglichkeiten. Mithilfe der viralen Transduktion können fremde Gene über Vektoren (Plasmide) in Zellen eingebracht werden. Schon 1928 entdeckte Griffith

bei Versuchen mit Pneumokokken, dass DNA zwischen Bakterien ausgetauscht werden kann.<sup>152</sup> 1956 stellte Lennox fest, dass auch die Übertragung von miteinander verbundener DNA mittels Bakteriophagen möglich ist.<sup>153</sup>

Zunächst wurden HEK293T-Zellen transfiziert und Virus produziert. Anschließend wurde dieser aufkonzentriert und die RCH-ACV-Zellen mittels der viralen Vektoren transduziert.

### **3.2.1.7.1 Transfektion von HEK293T**

Bei der Virusproduktion muss zwischen lentiviralen und retroviralen Vektoren unterschieden werden. Retroviren integrieren ihre DNA stabil in das Genom des Wirtes, während HEK-Zellen bei der Transfektion mit lentiviralen Vektoren transient mit dem Virus transfiziert werden. Lentiviren können ihre Gene in das Genom von sich teilenden und nicht-teilenden Zellen integrieren.<sup>154</sup> Außerdem ist beschrieben, dass Lentiviren – wie beispielsweise HI-Viren – zusätzliche akzessorische Gene besitzen, mit denen sie ihre eigene Transkription beeinflussen können.<sup>155</sup> Bei dem MSCV N-term HA-FLAG puro-Plasmid handelt es sich um einen retroviralen Vektor; das LT3-GECIR- sowie das LT3-GEPIR-Plasmid sind lentivirale Vektoren.

Für die Produktion der Viren werden HEK293T-Zellen verwendet, welche – im Gegensatz zu HEK293 – zusätzlich das *SV40 large T antigen*-Gen exprimieren.<sup>156</sup> Dies hat zur Folge, dass in HEK293T Plasmide repliziert werden können, die den „*SV40 origin of replication*“ enthalten, was die Effizienz der Transfektion deutlich erhöht.<sup>157</sup>

Je nach Verwendung von Retro- oder Lentiviren werden die in Tabelle 29 bzw. Tabelle 30 angegebenen Plasmide benötigt. Das Transferplasmid enthält jeweils die zu exprimierenden Gene. Die Verpackungsplasmide (*packaging*) codieren für strukturelle Proteine wie *gag/pol*, die für den Zusammenbau des Virus notwendig sind.<sup>158</sup> Als Hüllplasmid (*envelope*) wird oftmals das Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) verwendet, da dieses eine Pseudotypisierung der viralen Hüllproteine bewirkt und dadurch die Transduktionseffizienz erhöht.<sup>159</sup>

Für die Transfektion der HEK293T wurden am Vorabend des Experiments jeweils 3 Millionen Zellen in 10 cm Platten ausgesät. Für ein Viruskonstrukt wurden jeweils 4 Platten benötigt. Nun wurden die Verpackungs- und Hüllplasmide in den unten angegebenen Mengen in einem Eppendorf-Gefäß à 2 ml mit dem einzufügenden Transferplasmid gemischt. Anschließend wurde das Volumen mit sterilem Wasser auf 1.800 µl aufgefüllt und 200 µl Calciumphosphat zugegeben. Dieses bewirkt die Fällung von unlöslichem Calciumphosphat und die Kopräzipitation der DNA. Die Calcium-DNA-Präzipitate können dann von den HEK-Zellen endozytotisch aufgenommen werden. Dieses hier durchgeführte Verfahren wird auch als Calciumphosphatpräzipitation bezeichnet.<sup>160</sup>

Als Nächstes wurde die Calciumphosphat-Lösung an einer Pipette herab unter ständiger Durchmischung in 2 ml *2x Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS-Lösung) getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils 1 ml der so produzierten Lösung vorsichtig zu einer 10 cm-Schale mit HEK-Zellen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in die S2-Anlage überführt. Nach 6 h Inkubation in einem Zellkulturinkubator wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

#### **Retrovirus:**

<b>Art des Plasmids</b>	<b>Name des Plasmids</b>	<b>benötigte Masse [µg/4 Platten]</b>
Envelope	M5 oder VSV-G Retro	8
Transfer	z.B. MSCV N-term HA-FLAG puro BRD7	20
Packaging	M643 oder M579 (gag/pol)	30

**Tabelle 29: Plasmide für Retrovirus-Produktion**

#### **Lentivirus:**

<b>Art des Plasmids</b>	<b>Name des Plasmids</b>	<b>benötigte Masse [µg/4 Platten]</b>
Envelope	pMD2G (VSV-G)	5
Transfer	z.B. LT3-GEPIR_shBRD7	20

Art des Plasmids	Name des Plasmids	benötigte Masse [µg/4 Platten]
Packaging	psPAX (gag/pol)	15

**Tabelle 30: Plasmide für Lentivirus-Produktion**

### 3.2.1.7.2 Ultrazentrifugation zur Virusaufkonzentrierung

Um den von den HEK-Zellen produzierten Virus aufzukonzentrieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Bei dem in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Verfahren wurde das Medium nach ca. 36 h Inkubation im Zellkulturinkubator vollständig abgenommen und einmal steril filtriert (Porengröße 0,45 µm). Anschließend wurde es in die Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 2 h bei 4 °C und 50.000 g herunterzentrifugiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und der Virus in ca. 200 µl RPMI-Medium resuspendiert. Der Virus wurde entweder direkt für eine Transfektion verwendet oder in Aliquots à 30 µl bei -80 °C bis zur Verwendung weggefroren.

### 3.2.1.7.3 Selektion der transduzierten Zellen

Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte je nach verwendetem Vektor. Der Vektor MSCV-HA-Flag-puro mit BRD7-Überexpression sowie der GECIR-Vektor, der für die Klonierung des Knockdowns von BRD7 verwendet wurde, kodieren beide zusätzlich für eine Puromycin-Resistenz. Daher wurde 3 Tage nach der Transduktion mit der Puromycin-Selektion begonnen. Dazu wurde 2 µg/µl Puromycin im Verhältnis 1:1.000 zu den Zellen gegeben und die Zellzahl und Viabilität nach einem Tag, nach 2 Tagen sowie im weiteren Verlauf bestimmt.

Der GECIR-Vektor, welcher für die BRD7-Überexpression kodiert, exprimiert konstitutiv mCherry und nach Induktion zusätzlich GFP. Somit wurden die Zellen etwa eine Woche nach der Transduktion induziert und nach weiteren 48 h am FACS Aria III™ sortiert. Dazu wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen zurückbehalten und die übrigen Zellen herunterzentrifugiert und einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden sie je nach Zellzahl in einem entsprechenden Volumen FACS-Puffer aufgenommen und vor dem Sortierungsvorgang durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt, um ein Verstopfen des FACS Aria III™ durch Zellaggregate zu verhindern. Die Zellen, welche sowohl mCherry als auch GFP-positiv waren,

wurden in ein neues Falcon sortiert und entweder direkt lysiert oder wieder in Kultur genommen. Sobald ein Anwachsen der sortierten Zellen festgestellt werden konnte, konnten die zurückbehaltenen unsortierten Zellen verworfen werden.

### **3.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.2.1 Lysieren von Zellen**

Um die Expression bestimmter Proteine untersuchen zu können, müssen zunächst Zelllysate hergestellt werden. Dazu wurden die Zellen bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und die Zellpellets in 1 ml kaltem DPBS aufgenommen. Nun wurden die Zellsuspensionen in Gefäße à 1,5 ml überführt und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 10 µl NP-40-Lysepuffer pro  $2 \cdot 10^6$  Zellen resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Proteinlysate von dem Zelldetritus zu trennen, wurden die Suspensionen anschließend für 10 min bei 21.830 g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurde dann bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.2.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde die BCA-Methode angewendet. Diese beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der es im alkalischen Milieu zur Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und zweiwertigen Kupferionen kommt. Bicinchoninsäure (BCA) zeigt hierbei durch einen Farbumschlag nach Violett die Bildung von einwertigen Kupferionen an. Die Stärke des Farbumschlages ist dabei proportional zur Proteinmenge in der untersuchten Probe.<sup>161</sup>

Von den Lysaten wurden jeweils 1,5 µl abgenommen und mit 1 ml der *BCA Protein Assay*-Lösung gemischt. Dabei wurden *Reagenz A* und *Reagenz B* im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proben in Küvetten mit Verengung überführt und am *NanoDrop 2000c* gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration mittels Eichgerade wurde parallel zu den Proben eine Standard-Reihe mit BSA in den Konzentrationen

2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  angesetzt und die jeweiligen Konzentrationen photometrisch bestimmt. Mithilfe dieser Standard-Reihe konnte dann die jeweilige Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

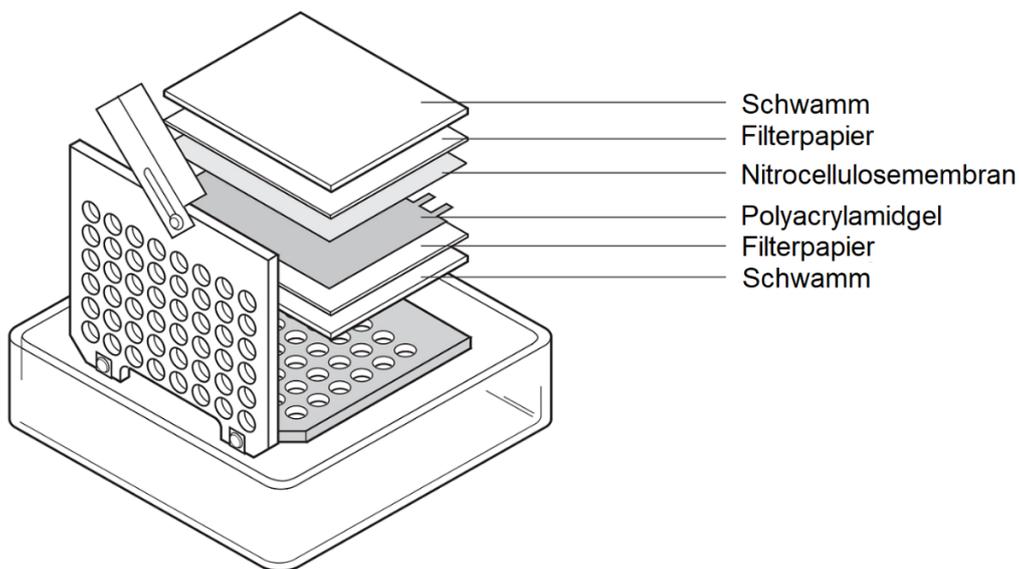
### **3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Masse erfolgt mithilfe der SDS-PAGE, welche 1966 zum ersten Mal von Maizel, Shapiro *et al.* beschrieben wurde.<sup>162</sup> Zunächst wurden die Proben mit 4-fach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt, welcher Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Dieses bewirkt eine Denaturierung der Proteine durch Störung ihrer räumlichen Struktur. Da es sich bei SDS um ein anionisches Tensid handelt, verleiht es den Proteinen eine negative Gesamtladung.<sup>163</sup> Dies hat zur Folge, dass sie in der Gelelektrophoresekammer beim Anlegen einer Spannung zur positiv geladenen Kathode wandern. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren.<sup>164</sup> Durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Puffer wurden zusätzlich Disulfidketten aufgespalten.<sup>165</sup> Anschließend wurden die Proben in die Kämme eines Polyacrylamidgels geladen und ein vorgefärbter Größenstandard (*Marker Precision Plus Dual All Blue Standards* oder *Marker Precision Plus Dual Color Standards*) aufgetragen. Es wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidgehalt von 8 % verwendet sowie 5-prozentige Sammelgele. Die Gele wurden in eine Blottingkammer überführt und anschließend eine Spannung von 70 Volt ( $\sim$  400 mA) für etwa 3 h angelegt.

### **3.2.2.4 Western Blot**

Nachdem die Proteine durch die Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde die so genannte Sandwich-Technik verwendet, bei der das Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  gelegt wurde. Bevor es in die Blottingkammer eingespannt wurde, wurden nun auf beiden Seiten je 2 Filterpapiere und ein Schwämmchen hinzugefügt, um durch Anwendung von leichtem Druck die Übertragung der Proben auf die Nitrozellulosemembran zu erleichtern (siehe Abbildung 23). Danach wurde eine Spannung von 70 V bis 90 V angelegt und die Proteine je nach ihrer Größe für 1,5 h bis 3 h übertragen.

Dabei ist auf eine ausreichende Kühlung der Blotting-Apparatur zu achten, um ein übermäßiges Erhitzen des Polyacrylamidgels zu verhindern.<sup>166</sup> Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden zunächst alle unspezifischen Bindungsstellen durch einstündige Inkubation in 5-prozentiger Milchpulverlösung blockiert. Da Phospho-Antikörper in der Milch enthaltene Proteine unspezifisch binden können, wurde bei Membranen, die mit einem Phospho-Antikörper inkubiert werden sollten, anstatt der Milchlösung eine 5-prozentige BSA-Lösung verwendet.

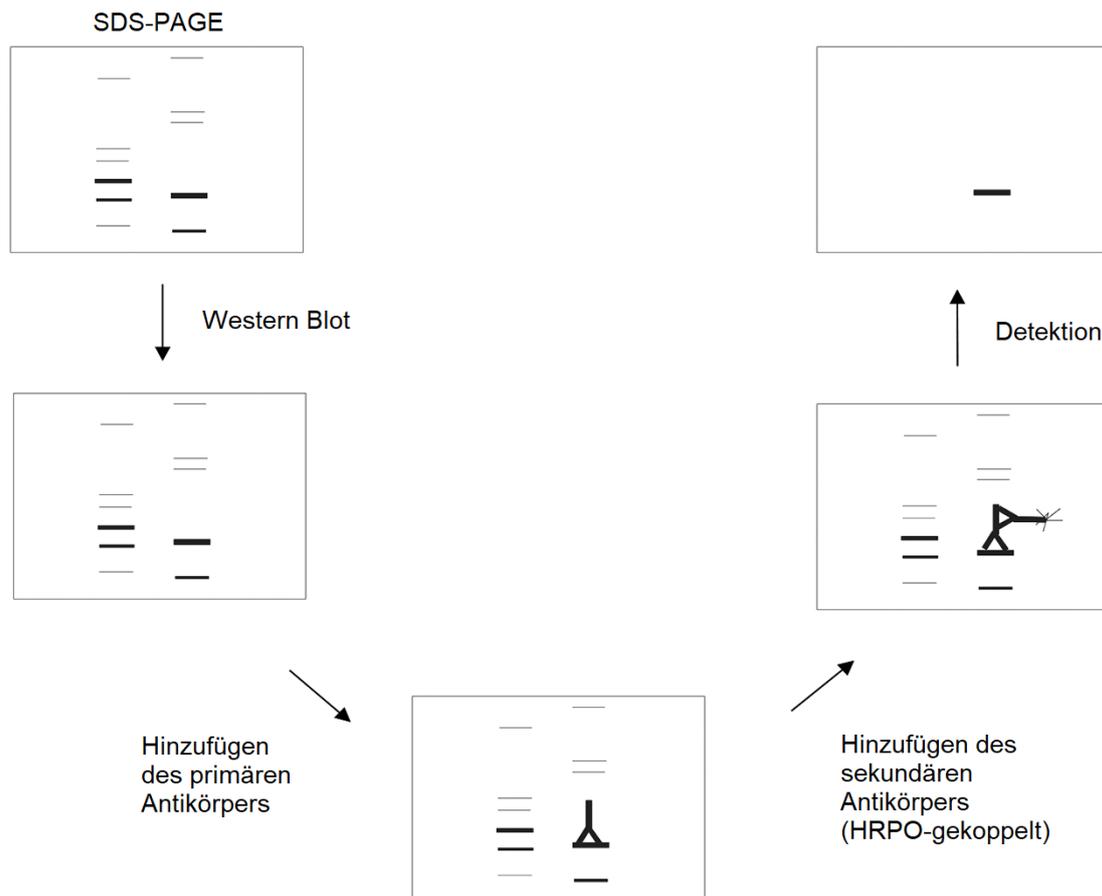


**Abbildung 23: Aufbau einer Western Blot Apparatur** Es wird das sogenannte „Sandwich-Prinzip“ verwendet, bei dem die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel beidseits von Filterpapier und Schwämmen eingefasst werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach dem Bio-Rad Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell - Instruction Manual, Seite 7.<sup>167</sup>

Nach Entfernung der Milchpulver- bzw. BSA-Lösung wurde der primäre Antikörper auf die Membran gegeben und entweder über Nacht im Kühlschrank oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme des primären Antikörpers und 3-maligem Waschen in TBST (*tris-buffered saline* + Tween 20) wurde dann der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:7.500 auf die Membran gegeben. Dieser ist HRPO- (Meerrettichperoxidase-) gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet. Nach 1 h Inkubation wurde der Antikörper verworfen und die Membran wiederum 3-mal gewaschen. Nach der Zugabe von Detektionsflüssigkeit (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* für stärkere Signale oder *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* für schwächere Signale) setzt die Meerrettichperoxidase das im ECL-Reagenz

enthaltene Substrat um. Das dabei entstehende Chemilumineszenzsignal kann anschließend am Abbildungssystem *Odyssey® Fc* detektiert werden. Zur abschließenden Aufarbeitung und Darstellung der detektierten Banden wurde die Software Adobe® Illustrator CS4 verwendet.

Der gesamte Ablauf bei der Durchführung eines Western Blots ist schematisch in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Schematische Darstellung des Vorgehens bei Durchführung eines Western Blots** Nach der Gelelektrophorese und dem Transfer auf die Nitrocellulosemembran wird der primäre Antikörper hinzugegeben, der an das gewünschte Protein bindet. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper auf die Membran gegeben, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und gleichzeitig mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe von Detektionsflüssigkeit kann das entstehende Chemilumineszenzsignal sichtbar gemacht werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kurien *et al.*<sup>168</sup>

### 3.2.2.4.1 Quantifizierung der Proteinexpression

Zur Quantifizierung einer Veränderung in der Proteinexpression wurden die mittels des Abbildungssystems *Odyssey® Fc* generierten Bilder mit der Software *ImageJ* geöffnet. Die Signalstärke der jeweiligen Bande wurde nun durch

Berechnung der Fläche unter dem Graphen (*area under the curve*) ermittelt und anschließend auf die jeweilige Kontrolle normalisiert.

### **3.2.2.5 Fraktionierung**

Mithilfe des *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kits* von *Thermo Fisher Scientific* können die im Zellkern vorhandenen Proteine getrennt von den im Zytoplasma lokalisierten Proteinen aufgeschlüsselt werden.

Dazu wurden  $2 \cdot 10^7$  BRD7-Überexpressionszellen sowie  $2 \cdot 10^7$  Kontrollzellen in Reaktionsgefäße überführt und das *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Zum Schluss konnte so die Menge an BRD7 im Nukleus und im Zytoplasma mithilfe eines Western Blots dargestellt werden.

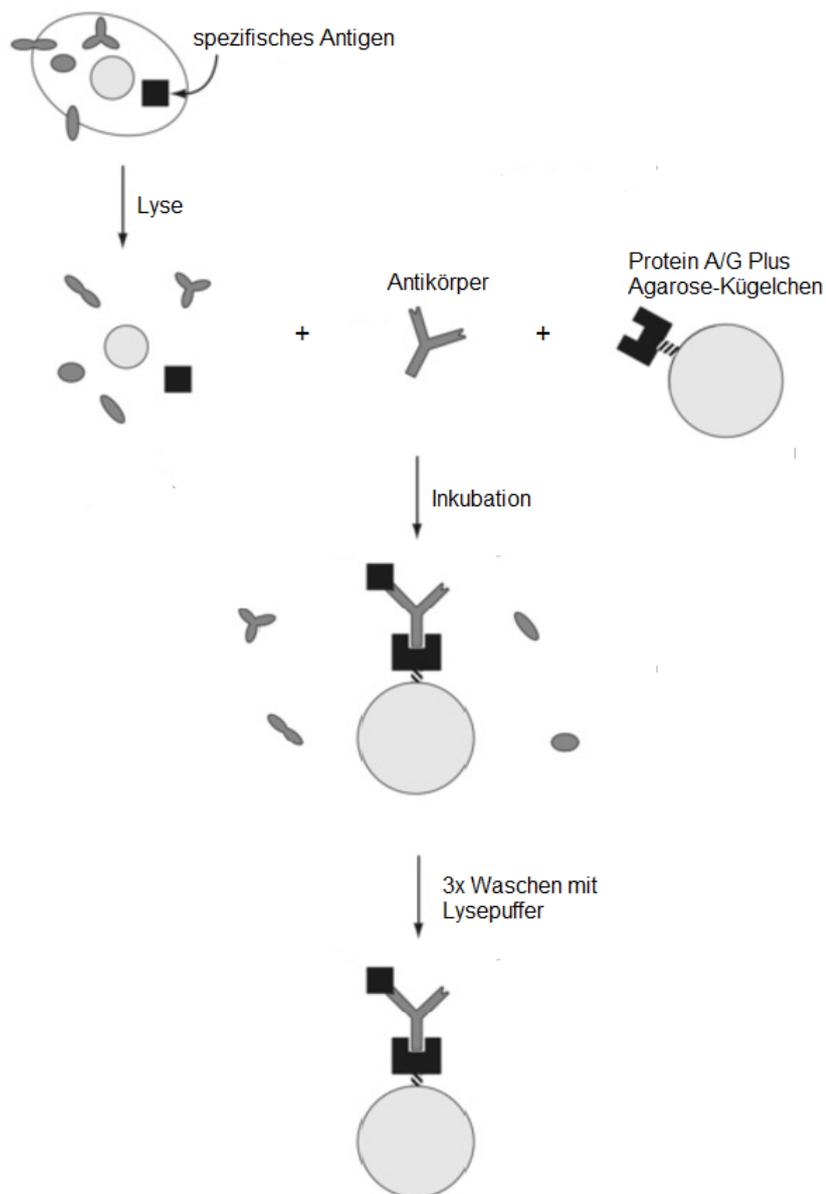
### **3.2.2.6 Immunopräzipitation (IP)**

Mithilfe der Immunopräzipitation können Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen werden.<sup>169</sup>

In dieser Dissertationsarbeit wurde die Interaktion von BRD7 mit Komponenten der PI3K untersucht. Dazu wurden  $6 \cdot 10^7$  Zellen nach dem bei 3.2.2.1 beschriebenen Verfahren in 800 µl NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde 1/10 des Lysats abgenommen und als Input-Kontrolle bei -20 °C weggefroren. Das restliche Lysat wurde aufgeteilt und die eine Hälfte mit 4 µg des p85-Antikörpers und die andere Hälfte mit 4 µg der Isotyp-Kontrolle versetzt. Über Nacht wurden die Proben bei 4 °C auf dem Multitrotator durchmischt. Am nächsten Tag wurden 30 µl *Protein A/G Plus Agarose*-Kügelchen einer 1:1 Lösung zu den beiden Lysaten zugegeben und sie wiederum für mindestens 1 h auf dem Multitrotator bei 4 °C inkubiert. In dieser Zeit bindet der Antikörper an die Kügelchen. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 400 g für 4 min herunterzentrifugiert. Dadurch wurde das jeweilige Protein (hier p85) mitsamt seiner Interaktionspartner präzipitiert und aufkonzentriert. Der Überstand, in dem sich die ungebundenen Proteine befanden, wurde durch vorsichtiges Abpipettieren verworfen. Nun wurde 400 µl gekühlter Lysepuffer auf die herunterzentrifugierten Kügelchen gegeben, die Proben sanft gemischt und wiederum abzentrifugiert (siehe oben). Nach zweimaligem Wiederholen des

Waschschritten wurden jeweils 60 µl Laemmli-Puffer zu den Kügelchen dazugegeben und die Proben für mindestens 5 min bei 95 °C aufgekocht. Vor der Auftragung in eine Gelelektrophorese-Kammer wurden die Proben bei 15.000 RPM abzentrifugiert, um die Kügelchen zu entfernen. Anschließend kann so die Interaktion der Proteine mithilfe des Western Blots gezeigt werden.

Der Ablauf der IP ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.



**Abbildung 25: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der IP** Nach der Zellyse werden die Proben mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Anschließend werden Protein A/G Plus Agarose-Kügelchen (*beads*) zugegeben, an welche nun der Antikörper bindet. Die an dem Antikörper haftenden Proteine werden anschließend durch Zentrifugation zusammen mit den Kügelchen heruntergezogen. Durch das Verwerfen des Überstandes sowie das mehrmalige Waschen mit Lysepuffer werden die ungebundenen Proteine entfernt. Mithilfe eines anschließend durchgeführten Western Blots kann die Interaktion mehrerer Proteine nachgewiesen werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bonifacio *et al.*<sup>170</sup>

### 3.2.3 DNA-Techniken

#### 3.2.3.1 Klonierung eines induzierbaren BRD7-Überexpressionsvektors

Zur Untersuchung der Funktion von BRD7 wurde ein Vektor kloniert, der nach Induktion BRD7 überexprimiert. Dazu wurde die BRD7-Sequenz aus einem von *Addgene* erworbenen MSCV-Vektor heraus in einen GECIR-Vektor umklont. Die dazu benötigten Primer wurden selbst designt und von *Sigma-Aldrich* erworben (siehe 3.1.7.3.1).

##### 3.2.3.1.1 Amplifikation BRD7 und P2A-Site

Zunächst wurde BRD7 aus dem erworbenen MSCV HA-Flag puro BRD7-Vektor herausamplifiziert. Da sich in der BRD7-Sequenz noch eine BamHI-Schnittstelle befand, die im weiteren Verlauf der Klonierung Probleme bereitet hätte, musste dies in zwei Etappen geschehen. Es wurde zunächst eine stumme Mutation in der Schnittstelle erzeugt, als die beiden Fragmente wieder zusammengefügt wurden. Außerdem wurde eine P2A-Site aus dem pLentiCRISPRv2-Vektor (*Addgene* #52961) amplifiziert. Diese wurde benötigt, da sie sicherstellt, dass das GFP, welches sich hinter der BRD7-Sequenz befinden sollte, nach Induktion der Zellen ebenfalls mit abgelesen wird.

Zur Amplifikation des ersten Teiles wurde das Primerpaar *BRD7\_1\_for\_os* und *BRD7\_1\_rev\_i1as* verwendet; für den zweiten Teil das Primerpaar *BRD7\_2\_for\_ias* und *BRD7\_2\_rev\_i2as*. Für die P2A-Site wurden die beiden Primer *BRD7\_P2A\_for\_i2s* und *BRD7\_P2A\_rev\_oas* eingesetzt. Außerdem wurden H<sub>2</sub>O-Kontrollen mitgezogen.

Ansatz PCR-Amplifizierung:

- 16,75 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl *Q5 Reaction Buffer*
- 0,5 µl dNTPs (10 mM)
- 0,125 µl Primer 1
- 0,125 µl Primer 2

Anschließend wurden jeweils 2 µl DNA und 0,25 µl *Q5 DNA Polymerase* (10 s/kb) hinzugegeben.

Polymerase-Kettenreaktion-(PCR-) Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [s]	
98	10	
Temperaturgradient von 60 bis 72	30	} 30x
72	35	
72	45	
4	∞	

Eine PCR dient der Amplifikation von DNA-Sequenzen und wurde 1987 erstmalig von Mullis *et al.* beschrieben.<sup>171</sup> Bei unterschiedlichen Temperaturen laufen die folgenden Schritte in zyklischer Wiederholung ab: Denaturierung, Primerbindung und Elongation. Die Denaturierung der DNA-Stränge findet bei ca. 98 °C statt und bewirkt ein Auseinanderlösen der beiden Stränge. Als Nächstes binden die Primer bei etwa 60 °C. Bei etwa 72 °C beginnen sie dann an beiden Strängen den komplementären Strang zu synthetisieren. Durch mehrfache Temperaturänderung laufen die Primerbindung und die Elongation des DNA-Stranges etwa 30-mal in Folge ab, sodass bis zu 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> Kopien der DNA-Sequenz hergestellt werden können.<sup>172</sup>

Der verwendete Temperaturgradient während der Phase der Primerbindung diente der Identifikation der optimalen Temperatur zur Hybridisierung der Primer. Dabei wurde jeweils eine Probe bei 60 °C, 64 °C, 68 °C und 72 °C behandelt. Anschließend wurden alle Proben zur Elongation auf 72 °C erhitzt. Im weiteren Verlauf konnte dann mit der Probe weitergearbeitet werden, bei der am meisten Substrat mit der gewünschten Basenpaarlänge gebildet wurde und somit die Amplifikation am besten funktioniert hatte.

### 3.2.3.1.2 Auftrennung über ein Agarosegel

Mithilfe der Aufreinigung über ein Agarosegel können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Anschließend kann das gewünschte Fragment extrahiert und mit diesem weitergearbeitet werden.

Es wurde ein 1-prozentiges Agarosegel gegossen, indem 1 g Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer aufgekocht wurde. Anschließend wurden

jeweils 4 µl *HDGreen® Safe DNA Dye* zugegeben, um die DNA-Banden anzufärben, damit sie unter UV-Licht detektiert werden konnten. Die Proben wurden mit 6-fach konzentriertem *DNA Loading Dye* versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Dann wurde eine Spannung von 100 V für etwa 1,5 h angelegt und im Anschluss die Banden unter UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Nun wurde die DNA aus dem Gel extrahiert, indem das *Gel Extraction Kit* von *Qiagen* nach Herstellerangaben verwendet wurde.

### 3.2.3.1.3 Zusammenfügen der 3 DNA-Fragmente

Anschließend wurde eine erneute PCR durchgeführt, um die 3 aus dem Gel extrahierten DNA-Fragmente aneinanderzuheften. Dazu wurden die Primer *BRD7\_1\_for\_os* und *BRD7\_P2A\_rev\_oas* verwendet.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	
98	20	} 32x
66	20	
72	90	
72	420	
4	∞	

Die BRD7-Sequenz trägt nun eine stumme Mutation an der Stelle, an der sich die BamHI-Schnittstelle befand. Anschließend wurde das Produkt – sowie die mitgezogene H<sub>2</sub>O-Kontrolle – auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bande auf der Höhe von etwa 2,2 kb ausgeschnitten. Hierbei handelt es sich um die Verknüpfung der P2A-Site mit der BRD7-Sequenz. Als Nächstes wurde die DNA mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* von *Qiagen* aus dem Gel extrahiert.

### 3.2.3.1.4 Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme können DNA-Fragmente durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen an spezifischen Basenpaarabfolgen schneiden.

Bei dem hier beschriebenen Reaktionsansatz wurden der GECIR-Vektor und das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Dadurch, dass das BRD7-Fragment und der Vektor mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, ist eine spätere Ligation der beiden DNA-Fragmente möglich.

Folgende Reaktionsansätze wurden verwendet:

- PCR-Produkt:
  - 30 µl PCR-Produkt
  - 4 µl Restriktionsenzym-Puffer
  - 2 µl BamHI
  - 6 µl H<sub>2</sub>O
- GECIR-Vektor:
  - 8 µg Vektor
  - 2 µl Restriktionsenzym-Puffer
  - 8 µl BamHI
  - 2 µl H<sub>2</sub>O

Die beiden Ansätze wurden jeweils für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl Alkalische Phosphatase Puffer und 1,5 µl Alkalische Phosphatase zum Ansatz mit dem GECIR-Vektor hinzugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Phosphatasen hydrolysieren die Esterbindung zwischen Phosphatresten und Hydroxylgruppen. Durch Zugabe von Alkalischer Phosphatase kann somit eine Religation der zuvor geschnittenen DNA-Fragmente verhindert werden, da die DNA-Ligase einen Phosphatrest sowie eine Hydroxylgruppe benötigt.

Als Nächstes wurden der Ansatz mit dem PCR-Produkt sowie der Ansatz mit dem GECIR-Vektor mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* von *Qiagen* aufgereinigt und zum Schluss in 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.2.3.1.5 Ligation**

Die Ligation beschreibt die Verbindung von DNA-Fragmenten durch die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen. Nachdem zwei DNA-Fragmente mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können sie nun durch die Ligase miteinander verknüpft werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die Klonierung der induzierbaren BRD7-Überexpression verwendet:

- 1,5 µl Vektor
- 8 µl Insert/H<sub>2</sub>O

- 2 µl Ligase Puffer
- 0,5 µl Ligase
- 8 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 15 °C inkubiert. Es wurde eine Wasserkontrolle mitgezogen, bei der statt des Inserts 8 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt wurden.

### **3.2.3.1.6 Entfernung der Kontrollsequenz Renilla**

Da sich im verwendeten GECIR-Vektor die Kontrollsequenz Renilla vor der inklonierten Sequenz, die für die BRD7-Überexpression kodiert, befand, musste diese noch aus dem Vektor herausgeschnitten werden.

Die shRNA-Sequenz ließe sich mithilfe der Restriktionsenzyme BsiWI und Mlul ausschneiden, jedoch befand sich noch eine zweite Mlul-Schnittstelle in dem Plasmid. Daher wurden Linker-Oligonukleotide designt, die die BsiWI- und die Mlul-Schnittstellen (zwischen denen sich die Kontrollsequenz befand) verbinden konnten (siehe 3.1.7.4).

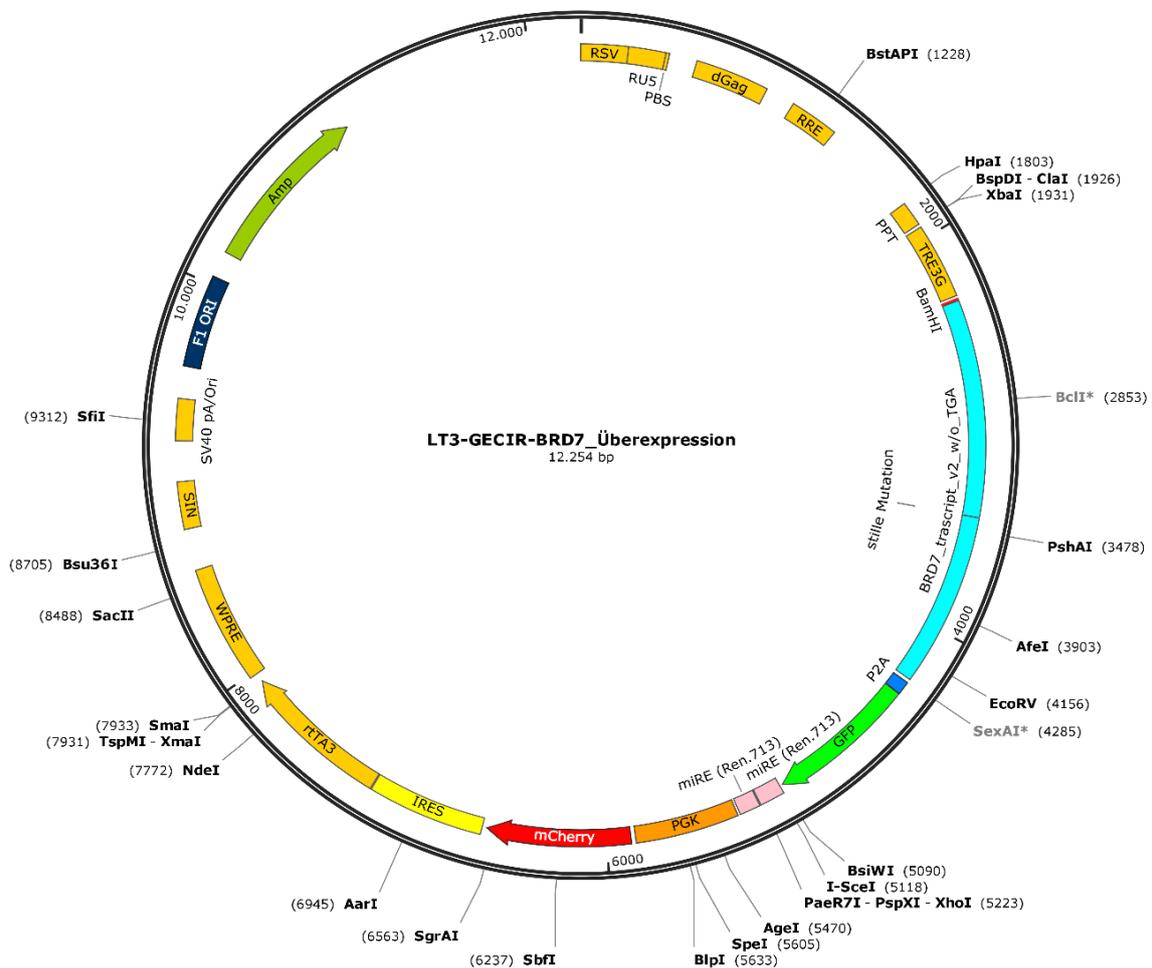
Zunächst wurden die beiden Linker-Oligonukleotide in H<sub>2</sub>O nach Herstellerangaben aufgelöst. Dazu wurden jeweils 200 ng der beiden Oligonukleotide in 17 µl H<sub>2</sub>O gelöst und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nun wurde das Reaktionsgemisch sehr langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, damit die Linker-Fragmente eine Doppelbindung zueinander eingehen konnten. Um die beiden Restriktionsschnittstellen zu aktivieren, wurde zunächst ein Verdau mit BsiWI (55 °C, 45 min) und anschließend ein Verdau mit Mlul (37 °C, 30 min) durchgeführt. Nach jedem Restriktionsschritt erfolgte eine Aufreinigung mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* von Qiagen, um die Reaktion abzustoppen. Da die Schmelztemperatur des Linker-Oligonukleotids *GECIR\_Link\_BsiWI\_Mlul\_s* bei 63,4 °C liegt, konnte keine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (bei 65 °C) durchgeführt werden.

Das Plasmid wurde auf die gleiche Weise zunächst mit BsiWI verdaut und im Anschluss hitzeinaktiviert. Danach wurde es durch Mlul geschnitten und auf ein 1-prozentiges Agarosegel aufgetragen. Nun wurden 3 Banden sichtbar: Die Bande bei ca. 10 kb entsprach dem Plasmid-Rückgrat („*Backbone*“). Das Insert mit etwa 2,6 kb stellte die Sequenz zwischen den beiden Mlul-Schnittstellen dar.

Bei dem kleineren Insert mit knapp 400 bp handelte es sich um die Kontrollsequenz Renilla. Die Banden bei 10 kb und bei 2,5 kb wurden ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von *Qiagen* extrahiert.

Zum Schluss wurde eine Ligation angesetzt mit dem Backbone, dem Linker-Oligonukleotid und dem 2.633 bp großen Fragment zwischen den beiden *MluI*-Schnittstellen.

Abbildung 26 visualisiert nun die unterschiedlichen Bestandteile des vollständig klonierten BRD7-Überexpressionsvektors anhand einer Plasmidkarte. Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind außen um das Plasmid angegeben.



**Abbildung 26: Darstellung der Bestandteile des induzierbaren BRD7-Überexpressions-Vektors sowie der Schnittstellen für Restriktionsenzyme** Der Vektor exprimiert konstitutiv mCherry (rot). Nach Induktion kommt es zusätzlich zur Überexpression von BRD7 (hellblau) und zur GFP-Expression (grün). Die Plasmidkarte wurde mithilfe des Programms *SnapGene* angefertigt.

### 3.2.3.1.7 Transformation und DNA-Isolierung

Die Aufnahme von DNA in *E. coli*-Zellen mittels Bakteriophagen wurde 1970 erstmalig von Mandel und Higa beschrieben.<sup>173</sup> Cohen und Chang stellten fest, dass unter Anwesenheit von Calciumionen auch Plasmid-DNA in *E. coli* aufgenommen werden kann.<sup>174</sup> Aufgrund der negativ geladenen Lipiddoppelschicht sind die Calciumionen notwendig, um die Adsorption von DNA zu ermöglichen. So erhalten *E. coli*, deren Fähigkeit fremde DNA aufzunehmen durch chemische Behandlung erhöht wird, eine so genannte nicht natürliche Kompetenz.<sup>173</sup>

Für die Transformation der Ligationen wurde zunächst die benötigte Anzahl an kompetenten *E. coli* (*New England BioLabs #C2987H*) für 10 min auf Eis leicht aufgetaut. Anschließend wurden sie mit den Ligationsansätzen vereinigt und für 30 min auf Eis gestellt. Dann erfolgte ein kurzer Hitzeschock von 60 s bei 42 °C um die Effizienz der DNA-Aufnahme zu erhöhen.<sup>174</sup> Nun wurden die Proben für mindestens 45 min und 500 RPM bei 37 °C im Thermozykler inkubiert. Danach wurden die Ansätze steril auf Agarplatten mit Ampicillinzusatz ausgestrichen und für 12 h bis 24 h im Bakterieninkubator bei 37 °C inkubiert. Durch den Ampicillinzusatz konnte sichergestellt werden, dass nur Bakterienkolonien hochwachsen, die das gewünschte BRD7-Überexpressionsplasmid – welches zusätzlich auch für eine Ampicillinresistenz kodiert – aufgenommen haben.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit der BRD7-Überexpression jeweils mit der H<sub>2</sub>O-Kontrolle verglichen. Falls signifikant mehr Klone als auf der Platte mit der Wasserkontrolle gewachsen waren, wurden je nach Anzahl der Klone 3 bis 5 Einzelklone gepickt. Diese wurden dann in Bakterienkulturröhrchen mit jeweils 3,5 ml *Lysogeny Broth-* (LB-) Medium (mit Ampicillinzusatz) überführt. Nun wurden sie über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Einzelklone bei 300 g abzentrifugiert und die DNA mit dem *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* von *Thermo Fisher Scientific* nach Herstellerangaben isoliert.

Die isolierte DNA wurde mit einem Sequenzierprimer (*BRD7\_seq\_for* oder *BRD7\_seq\_rev*) zu der Firma *Microsynth Seqlab* nach Göttingen zur Sequenzierung geschickt.

Sequenzierungsansatz:

- 1,275 µg Plasmid-DNA
- 3 µl Sequenzierprimer (10 µM)
- ad 15 µl H<sub>2</sub>O

Mithilfe der Sequenzierung konnten die Einzelklone identifiziert werden, bei denen die Oligonukleotide mit der BRD7-Überexpression wie gewünscht einkloniert worden waren.

#### **3.2.3.1.7.1 Retransformation**

Die Retransformation dient der Amplifikation der DNA-Sequenzen, bei denen per Sequenzierung bestätigt wurde, dass das Plasmid wie gewünscht zusammengebaut wurde und sie somit die korrekte Basenabfolge tragen. Dazu wurde die jeweilige DNA wiederum mit kompetenten *E. coli* vereinigt und anschließend wurden Einzelklone hochwachsen gelassen.

Am darauffolgenden Tag wurden am Morgen zunächst 3 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz mit den Bakterienansätzen beimpft. Diese wurden dann den Tag über bei 37 °C auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Am Abend wurden die Vorkulturen in große Bakterienflaschen mit 200 ml Medium überführt und über Nacht weiter hochwachsen gelassen. So konnte eine größere DNA-Menge mit der gewünschten Sequenz gewonnen werden.

Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen in 4 Falcons à 50 ml überführt und bei 3.300 g für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurden sie entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren oder die DNA mit dem *NucleoBond® Xtra Midi EF Kit* von *Machery-Nagel* nach Herstellerangaben isoliert. Mit diesem können – im Gegensatz zur oben beschriebenen DNA-Isolierung mit dem *Miniprep Kit*– größere DNA-Mengen isoliert werden.

#### **3.2.3.1.7.2 Glycerolstock**

Vor dem Abzentrifugieren der Bakteriensuspensionen konnten jeweils 770 µl der Lösungen für einen Glycerolstock abgenommen werden. Die Bakterienlösungen wurden mit 230 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C weggefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten dann ein paar Mikroliter des Glycerolstocks in LB-

Medium überführt werden. So konnten die Klone, die die Plasmide mit der gewünschten DNA-Sequenz aufgenommen hatten, direkt hochwachsen.

### **3.2.3.2 Klonierung eines GECIR-Leervektors**

Für den induzierbaren BRD7-Überexpressionsvektor wurde ein passender Leervektor als Kontrollvektor in den Experimenten benötigt.

Dazu wurde BRD7 aus dem klonierten Überexpressionsvektor mithilfe von BamHI herausgeschnitten. Anschließend wurde die Probe mittels eines Agarosegels aufgetrennt und der Backbone (ca. 10 kb) herausgeschnitten. Dann wurde er unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* von *Qiagen* aus dem Gel extrahiert und anschließend religiert.

### **3.2.3.3 Retransformation eines konstitutiv aktiven BRD7-Überexpressionsvektors**

Nun wurde untersucht, ob die mit dem induzierbaren BRD7-Überexpressionsvektor gewonnenen Ergebnisse auch in einem anderen Vektorsystem bestätigt werden können. Dazu wurde ein konstitutiv aktiver Vektor von *Addgene* erworben. Es handelte sich um einen MSCV-Vektor mit einem HA- und einem Flag-Tag sowie einer Puromycin-Resistenz. Mit diesem Vektor wurden eine Retransformation durchgeführt und ein Einzelklon gepickt. Anschließend wurden die DNA mithilfe des *NucleoBond® Xtra Midi EF Kits* isoliert und Viren hergestellt (siehe 3.2.1.7).

### **3.2.3.4 Klonierung von Vektoren mit BRD7-Knockdown**

Zur Klonierung von Vektoren mit einem Knockdown von BRD7 wurden 2 Oligonukleotide von *Sigma-Aldrich* erworben und in den GEPIR-Vektor einkloniert.

#### **3.2.3.4.1 PCR mit BRD7-Knockdown-Oligonukleotiden**

Zur Amplifikation der BRD7-Knockdown-Oligonukleotide wurde eine PCR durchgeführt.

Reaktionsansatz (Mastermix):

- 10 µl Reaktionspuffer (Pfu Puffer mit MgSO<sub>4</sub>)
- 5 µl DMSO
- 5 µl GC-melt (5 M Betaine)
- 2 µl dNTPs, 10 mM
- 1 µl Primer *miRE\_denovo\_Xho1\_for*
- 1 µl Primer *miRE\_denovo\_EcoR1\_rev*
- Ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Mit den oben genannten Reagenzien wurde ein Mastermix angesetzt: Dieser wurde auf 3 Ansätze aufgeteilt und es wurde jeweils 1 µl der BRD7-Oligonukleotide (bzw. 1 µl H<sub>2</sub>O) und 1 µl Pfu DNase zugegeben.

Nun wurde das folgenden PCR-Programm durchgeführt:

Temperatur [°C]	Dauer [s]	
95	30	
95	30	} 25x
54	30	
72	60	
4	∞	

Anschließend wurden die Proben über ein Agarosegel aufgereinigt und die Banden bei 130 bp, welchen den BRD7-Oligonukleotiden entsprachen, unter UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Nun wurde die DNA aus dem Gel extrahiert, indem das *Gel Extraction Kit* von *Qiagen* nach Herstellerangaben verwendet wurde.

#### 3.2.3.4.2 Restriktionsverdau mit XhoI und EcoRI

Restriktionsansatz 1: 2 Ansätze mit den BRD7-Knockdown-Oligonukleotiden

- 25 µl PCR-Produkt
- 1 µl XhoI
- 3 µl Restriktionsenzym-Puffer
- 1 µl H<sub>2</sub>O

Restriktionsansatz 2: 1 Ansatz mit dem GEPIR-Plasmid

- 1 µl GEPIR-Plasmid
- 1 µl XhoI
- 3 µl Restriktionsenzym-Puffer
- 21 µl H<sub>2</sub>O

Beide Restriktionsansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils 1 µl EcoRI zu den Ansätzen hinzugegeben und die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nun wurde der Ansatz mit dem GEPIR-Plasmid für 5 min bei 80 °C aufgeköcht um die Enzymreaktion abzustoppen. Anschließend wurden 2 µl Fast Alkalische Phosphatase zu diesem Ansatz hinzugegeben und die Probe wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die Ansätze mit den BRD7-Knockdown-Oligonukleotiden bei -20 °C zwischengelagert.

Anschließend wurden alle Reaktionsansätze mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von *Qiagen* nach Herstellerangaben aufgereinigt und in jeweils 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **3.2.3.4.3 Ligation**

Als Nächstes wurden die amplifizierten BRD7-Knockdown-Oligonukleotide in den LT3-GEPIR-Vektor einkloniert. Dazu wurde folgender Ligationsansatz vorbereitet:

- 8 µl Oligonukleotid/H<sub>2</sub>O
- 2 µl LT3-GEPIR-Vektor
- 2 µl T4-Ligase-Puffer
- 7 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl T4-Ligase

Die oben genannten Reagenzien wurden gemischt und anschließend über Nacht bei 15 °C ligiert. Es wurde eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle mitgeführt, bei der statt 8 µl des Oligonukleotids 8 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt wurden.

An dieser Stelle folgten die Transformation und DNA-Isolierung nach den oben beschriebenen Verfahren (siehe 3.2.3.1.7).

## **3.2.4 RNA-Techniken**

### **3.2.4.1 RNA-Extraktion**

Zur Vermeidung von Kontaminationen findet die Extraktion der RNA komplett unter dem Abzug statt. Außerdem werden nur gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Für die RNA-Extraktion werden etwa  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen benötigt. Die Zellen wurden in Reaktionsgefäße à 15 ml überführt, einmal mit PBS gewaschen und dann in Eppendorfggefäße à 1,5 ml überführt. Anschließend wurden die Proben in 1 ml Trizol lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben zur Durchmischung 15 s stark geschüttelt. Nach 2-minütiger bis 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden sie bei 12.000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, sodass sich die Proben in 3 Phasen aufgespaltet hatten. Die wässrige obere Phase, in der sich die RNA befand, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Bei Bedarf konnte der Schritt der Chloroformzugabe wiederholt werden, sodass sichergestellt werden konnte, dass möglichst nur die RNA-Phase abgenommen wurde. Zur Präzipitation wurde diese dann mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min bis 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, sodass sich das RNA-Präzipitat am Boden absetzte. Jetzt wurde das Isopropanol abgenommen und die Proben zweimal mit Ethanol gewaschen. Dazu wurde jeweils 1 ml 75-prozentiges Ethanol auf das Pellet gegeben und die Proben dann bei 7.500 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Besonders beim letzten Schritt musste das Ethanol vollständig abgenommen werden. Das Pellet wurde dann für 5 min bis 10 min getrocknet und anschließend in 30 µl RNA-freiem Wasser eluiert.

Die RNA-Extraktion wurde bei den konstitutiv BRD7-überexprimierenden RCH-ACV und den Kontrollzellen (Wildtypzellen) durchgeführt.

### **3.2.4.2 DNase-Verdau**

Im nächsten Schritt wurden ein DNase-Verdau durchgeführt, um eine Verunreinigung der RNA durch DNA-Reste zu vermeiden. Für den DNase-Verdau wurden 5 µg RNA eingesetzt.

Reaktionsansatz:

- 5 µg RNA
- 0,5 µl DNase
- 2,5 µl 10x DNase Buffer
- Ad 25 µl H<sub>2</sub>O

Die oben aufgeführten Reagenzien wurden gemischt und für 20 min bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2,5 µl *DNase Inactivation Reagent* zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Nach anderthalb-minütiger Zentrifugation bei 10.000 g wurden 20 µl der RNA-Lösung abgenommen.

### 3.2.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese entspricht einer reversen Transkription und wurde in Gefäßen à 0,2 ml angesetzt. Es wurden 250 ng DNase verdaute RNA mit steril abgefülltem Wasser vereinigt, sodass man ein Gesamtvolumen von 11 µl erhielt. Anschließend wurde jeweils 1 µl *Random Hexamer*-Primer hinzugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt, nachdem sie kurz herunterzentrifugiert worden waren.

Nun wurde ein Mastermix angesetzt:

- 4 µl 5x Reaktionspuffer
- 1 µl *Ribolock RNase Inhibitor* (20 U/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix

Der Mastermix-Ansatz wurde auf die Proben aufgeteilt und jeweils noch 1 µl *Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase* (200 U/µl) hinzugegeben. Anschließend wurde das folgende cDNA-Programm durchgeführt (Gesamtvolumen 20 µl):

Temperatur [°C]	Dauer [min]
25	5
42	60
70	5

Nun konnte die cDNA weggefroren werden. Bei einer Lagerungszeit unter einer Woche konnte sie im -20 °C-Gefrierschrank aufbewahrt werden; bei einer längeren Aufbewahrungszeit bei -80 °C.

#### **3.2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)**

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR kann die Amplifikation von Nukleinsäuren in Echtzeit beobachtet werden. Man unterscheidet dabei zwei Verfahren:

Zum einen kann ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, der an doppelsträngige DNA bindet und somit ein umso stärkeres Fluoreszenzsignal liefert, je mehr dsDNA vorhanden ist.<sup>175</sup> Zum anderen können zweifach fluoreszenzmarkierte Proben verwendet werden, die einen Reporter-Farbstoff und einen zweiten Farbstoff tragen, der das Emissionsspektrum des Reporter-Farbstoffs auslöscht. Während der PCR-Vervielfältigung wird nun dieser Farbstoff von der Probe abgekappt, sodass es zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt, welche direkt von dem Gerät detektiert werden kann. Je früher der Anstieg der Fluoreszenz geschieht, desto mehr von der zu untersuchenden DNA befindet sich in der Probe.<sup>176</sup>

Mit den RCH-ACV mit konstitutiver BRD7-Überexpression sowie den Kontrollzellen wurde eine qPCR durchgeführt, um das Ausmaß der BRD7-Überexpression auf mRNA-Ebene darzustellen. Es wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* und das PCR-Gerät *StepOne™ Real-Time PCR Systems* von *Thermo Fisher Scientific* verwendet.

Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt:

- 10 µl *Fast SYBR® Green Master Mix*
- 3 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl Primer *Forward*
- 1 µl Primer *Reverse*

Es wurden die BRD7-Primer *hBRD7\_for* und *hBRD7\_rev* verwendet; als Ladekontrolle wurden Aktin-Primer eingesetzt. Der Mastermix wurde jeweils 10-fach angesetzt; einmal für BRD7 und einmal für Aktin. Anschließend wurden jeweils 15 µl des Mastermixes nach folgendem Schema in 8 Wells einer 48-Well-

Platte pipettiert. „K“ steht hierbei für „Kontrolle“, „BRD7\_ov“ für die „BRD7-Überexpression“.

<b>48-Well</b>								
<b>BRD7</b>	K	K	K	BRD7_ov	BRD7_ov	BRD7_ov	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
<b>Aktin</b>	K	K	K	BRD7_ov	BRD7_ov	BRD7_ov	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 31: Pipettierschema für den qPCR-Ansatz in einer 48-Well-Platte**

Anschließend wurden 5 µl cDNA (1:10 verdünnt) hinzugegeben. Um technische Replikate zu erhalten, wurden die zu untersuchenden Proben jeweils dreimal aufgetragen. Außerdem wurden für beide Primerpaare jeweils zwei Wasserkontrollen mitgezogen.

Nun wurden das „Fast Programm“ des PCR-Gerätes verwendet und der Beginn des Anstiegs der Fluoreszenz detektiert. Zum Schluss wurde die Schmelzkurve analysiert, um die Spezifität der Reaktion zu kontrollieren.

#### 3.2.4.4.1 Schwellenwert Ct

Der *Cycle Threshold* (Ct) beschreibt den Schwellenwert, bei dem zum ersten Mal eine signifikante Menge an Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Um die ermittelten Werte normalisieren zu können, wurden die Ct-Werte für Aktin mitbestimmt, da diese unabhängig von der BRD7-Überexpression in allen Zellen gleich sein sollten. Zunächst wurde der Mittelwert der 3 Triplikate berechnet. Anschließend wurde für die BRD7-Überexpressionszellen („BRD7\_ov“) sowie für die Kontrollzellen („K“) der Aktin-Schwellenwert vom BRD7-Schwellenwert abgezogen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzwert}}$$

$$\Delta Ct_{\text{BRD7\_ov}} = \mu_{\text{BRD7\_ov, BRD7}} - \mu_{\text{BRD7\_ov, Aktin}}$$

$$\Delta Ct_{\text{K}} = \mu_{\text{K, BRD7}} - \mu_{\text{K, Aktin}}$$

Danach wurde der  $\Delta Ct$  der Kontrollzellen vom  $\Delta Ct$ -Wert der Überexpression subtrahiert:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{BRD7}_{\text{ov}}} - \Delta Ct_K$$

Die relative Expression E gab nun das Ausmaß der BRD7-Überexpression im Vergleich zum Wildtyp an. Sie berechnet sich nach dem *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR 1* von *Applied Biosystems*<sup>177</sup> nach folgender Formel:

$$E = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Um zu überprüfen, ob sich die errechnete relative Expression in Kontroll- und BRD7-Überexpressionszellen signifikant unterscheidet und ob diese Differenz nicht nur Folge einer großen Schwankungsbreite der Ergebnisse ist, wurde die Standardabweichung von  $\Delta\Delta Ct$  nach linearer Fehlerfortpflanzung errechnet:

$$\sigma_{\Delta\Delta Ct}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \sigma_4^2$$

Die Standardabweichung des gesamten Terms berechnet sich anhand folgender Formel:

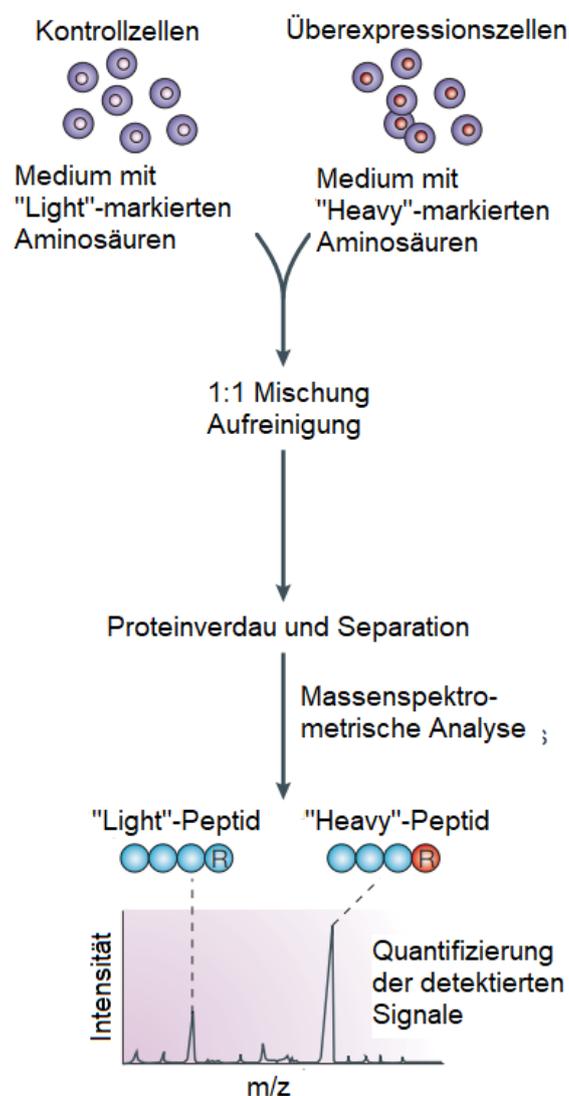
$$\begin{aligned} \sigma_E^2 &= \left| \frac{\delta}{\delta(\Delta\Delta Ct)} E(\Delta\Delta Ct) \right| \cdot \sigma_{\Delta\Delta Ct}^2 \\ &= \left| -\ln(2) \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct} \right| \cdot \sigma_{\Delta\Delta Ct}^2 \end{aligned}$$

### 3.2.5 Massenspektrometrie: Globales Proteom

Mithilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen kann die Gesamtheit der Proteine einer Zelllinie analysiert werden. Dabei werden die Proteine in Ionen aufgespalten, welche anhand ihrer elektrischen und magnetischen Eigenschaften aufgetrennt werden können.<sup>178</sup>

Unterschiedliche Konditionen können bei massenspektrometrischen Analysen mittels *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC) verglichen werden. Die Zellpopulationen werden in speziellen Medien kultiviert, die unterschiedliche Isotope essenzieller Aminosäuren enthalten. Meistens werden dazu Lysin- und Arginin-Isotope verwendet (siehe 3.1.9.1). Für die Proteinbiosynthese werden einer der beiden Zellpopulationen schwerere Isotopenvarianten angeboten als der anderen Kondition. Dies hat zur Folge, dass die gebildeten Proteine des einen Ansatzes Aminosäuren mit größerer Masse

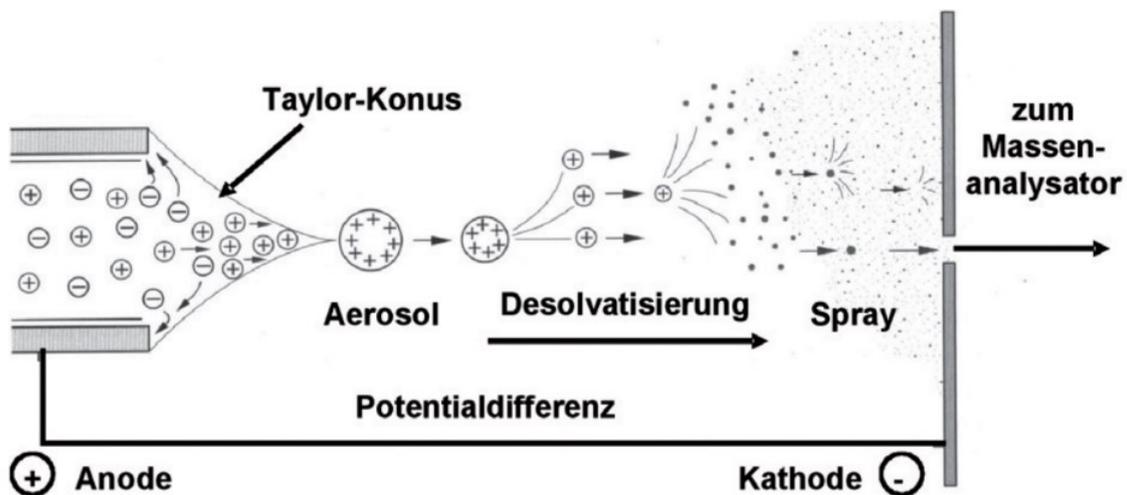
enthalten und sie somit nachträglich der jeweiligen Zellpopulation zugeordnet werden können.<sup>179</sup> Zunächst werden die beiden Konditionen gemischt und anschließend mittels SDS-PAGE aufgereinigt. Danach werden die Proteine durch Proteasen gespalten. Meistens wird dabei Trypsin verwendet, da dieses an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten schneidet. Als Nächstes werden die Peptide chromatographisch mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) aufgetrennt. Da dabei eine hydrophobe Säule verwendet wird, werden die hydrophilen Peptide schneller als die hydrophoben eluiert und als Erstes zum Massenspektrometer geleitet.<sup>180</sup>



**Abbildung 27: Schematische Darstellung einer massenspektrometrischen Analyse**  
 Nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Aminosäure-Isotopen markiert worden sind, werden die Konditionen gemischt und aufgereinigt. Anschließend werden die Proteine verdaut und die einzelnen Peptide massenspektrometrisch analysiert (siehe unten). Aufgrund der Aminosäuren-Markierung können schließlich zwei Peaks für das gleiche Peptid detektiert werden und die Unterschiede in der Signalstärke quantifiziert werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Steen und Mann.<sup>180</sup>

Der gesamte Ablauf bei der Durchführung einer massenspektrometrischen Analyse ist in Abbildung 27 schematisch dargestellt.

Im Allgemeinen besteht ein Massenspektrometer aus 3 Teilen: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Die Auftrennung in Ionen erfolgt meistens durch die Elektrospray Ionisation (ESI). Dabei werden die Peptide in einer Analyseflüssigkeit durch eine dünne Kapillare geleitet, an der eine hohe Spannung angelegt ist.<sup>181</sup> Am Ende der Kapillare bildet sich zunächst ein Flüssigkeitskonus, der Taylor-Konus genannt wird.<sup>182</sup> Aufgrund der angelegten Spannung zerfällt dieser, sodass kleine Tröpfchen gebildet werden, welche im elektrischen Feld beschleunigt werden. Durch Verdampfen des Lösungsmittels nimmt der Radius der Tröpfchen immer weiter ab, bis sich die Peptide durch die hohe Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche in Ionen aufspalten. Dieses Überführen der Ionen in die Gasphase wird als Desolvatisierung bezeichnet. Anschließend werden die Ionen zum Massenanalysator geleitet.<sup>181</sup> In Abbildung 28 sind die Prozesse bei der ESI schematisch dargestellt.



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Prozesse bei der ESI** Aufgrund der angelegten Spannung am Ende der Kapillare bildet sich zunächst ein Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus), welcher anschließend in kleine Tropfen zerfällt. Aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte zerfallen die Tropfen anschließend in gasförmige Ionen (Desolvatisierung) und werden zum Massenanalysator geleitet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hagen.<sup>182</sup>

Im Massenanalysator werden die Proteine anschließend anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) aufgetrennt. Dies kann durch unterschiedliche Methoden geschehen: Eine Möglichkeit ist die Auftrennung anhand der Flugzeit der Ionen, wobei diese sehr stark beschleunigt werden. Leichtere Ionen weisen dann eine höhere Geschwindigkeit auf. Dieses Verfahren wird als *time-of-flight*-

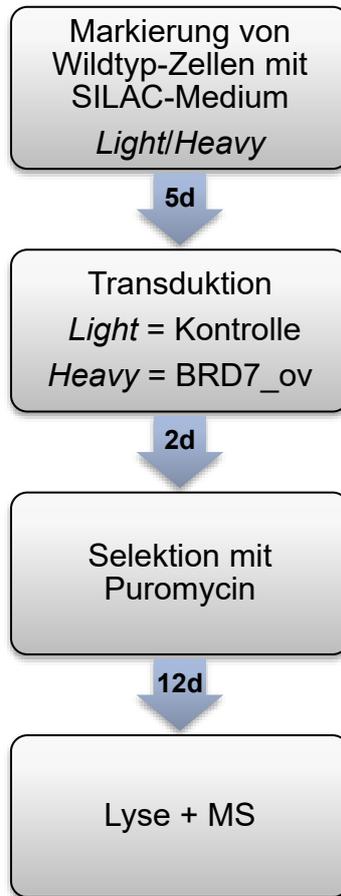
(TOF)-Massenspektrometrie bezeichnet. Eine weitere Methode ist die Auftrennung durch vierpolige Quadrupol-Geräte. Dabei wird ein zeitlich wechselndes hochfrequentes elektrisches Feld zwischen den Quadrupolstäben aufgebaut. Dadurch können immer nur Ionen mit einem spezifischen  $m/z$  die Stäbe passieren und detektiert werden. Außerdem können die Peptide durch so genannte Ionenfallen unter Verwendung von elektrischen oder magnetischen Feldern aufgetrennt werden. Bei diesem Verfahren werden die Ionen innerhalb der Apparatur auf stabilen Bahnen gehalten und anschließend analysiert.<sup>183,184</sup> Darüber hinaus gibt es kombinierte Auftrennungsverfahren: Beim Orbitrap-Massenspektrometer handelt es sich um eine Ionenfalle, bei der ein elektrostatisches Feld zwischen einer inneren und einer äußeren Elektrode aufgebaut wird. Die zwischen diesen beiden Elektroden hineingeleiteten Ionen kreisen nun spiralförmig um die innere Elektrode. Dabei ist ihre Oszillationsfrequenz proportional zur Quadratwurzel ihres  $m/z$  und unabhängig von ihrer Anfangsenergie und dem Winkel, in dem sie in die Apparatur eingespeist werden.<sup>185</sup>

Zum Schluss werden die auftreffenden Peptide vom Detektor erfasst und die ermittelten Daten visualisiert. Dabei wird die gemessene Signalintensität gegen das jeweilige  $m/z$  aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen Masse ihrer Aminosäuren erhält man somit zwei Peaks für das gleiche Peptid aus den beiden Versuchsansätzen. Anhand der Signalintensitäten kann daher festgestellt werden, ob eine quantitative Regulation dieses Peptids in der zu untersuchenden Zellpopulation stattfand.

In dieser Dissertationsarbeit wurde untersucht, welche Veränderungen des globalen Proteoms der RCH-ACV durch eine Überexpression von BRD7 bewirkt werden. Somit wurde analysiert, welche Proteine in BRD7-Überexpressionzellen hoch- oder herunterreguliert werden.

Bei dem MSCV HA-Flag puro BRD7-Vektor handelt es sich um einen konstitutiv aktiven Vektor. Um Anpassungen der Zellen an die BRD7-Überexpression zu vermeiden, sollte die Zeit, in der Überexpression aktiv ist, möglichst kurz gehalten werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen zunächst mit SILAC-Medium markiert und erst anschließend mit dem Überexpressionsvektor und dem

Kontrollvektor transduziert. Das Vorgehen bei diesem Versuch ist in Abbildung 29 schematisch dargestellt:



**Abbildung 29: Schematische Darstellung des Vorgehens zur massenspektrometrischen Analyse des globalen Proteoms der BRD7-Überexpressionszellen im Vergleich zu Kontrollzellen** Die Zellen wurden zunächst mit SILAC-Medium *Light* und *Heavy* markiert. Nach 5 Tagen wurden sie transduziert. 2 Tage später wurde die Selektion mit Puromycin gestartet und weitere 12 Tage danach wurden die Zellen in NP-40-Puffer lysiert und via Massenspektrometrie (MS) analysiert.

Es wurden jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen bei 300 g für 5 min herunterzentrifugiert und in 5 ml SILAC-Medium ausgesät; ein Ansatz wurde mit leichten (L-Arginin, L-Lysin), der andere mit schweren Aminosäure-Isotopen (L-Arginin +10, L-Lysin +8) versetzt. Nun wurden die Zellen nach den bei 3.2.1.2 beschriebenen Methoden weiter kultiviert. Nachdem die Zellen in dem Medium gut angewachsen waren, wurden die *Light*-markierten Zellen mit dem MSCV HA-Flag puro empty-Vektor und die *Heavy*-markierten Zellen mit dem MSCV HA-Flag puro BRD7-Überexpressionsplasmid transduziert. Nach 2 Tagen Inkubation wurde mit der Puromycin-Selektion begonnen und alle 2 Tage wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Als die Zellen eine Viabilität über 80 % aufwiesen, wurden sie in

NP-40-Lysepuffer lysiert und die Lysate in Eppendorfgefäßen bei -80 °C weggefroren.

Die weitere Probenaufarbeitung erfolgte durch Martine Pape; die massenspektrometrischen Messungen wurden im *Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie* in Göttingen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Dr. Björn Häupl. Dabei wurden die ermittelten Proteine annotiert und im Anschluss Anreicherungsanalysen der Annotationen durchgeführt. Diese wurden dann mit den Datenbanken *GOCC (Geneontology)*<sup>186</sup>, *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*<sup>187</sup> und *Reactome*<sup>188</sup> abgeglichen. Somit konnte ermittelt werden, welche Signalwege in BRD7-Überexpressionszellen im Vergleich zu Kontrollzellen reguliert sind.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der RCH-ACV

Zwei wichtige Signalwege, die vom Prä-B-Zellrezeptor (Prä-BZR) ausgehen, sind der PI3K- und der MEK-Signalweg. Im Folgenden wurde die Bedeutung dieser Signalwege in den Prä-B-Zellen RCH-ACV untersucht.

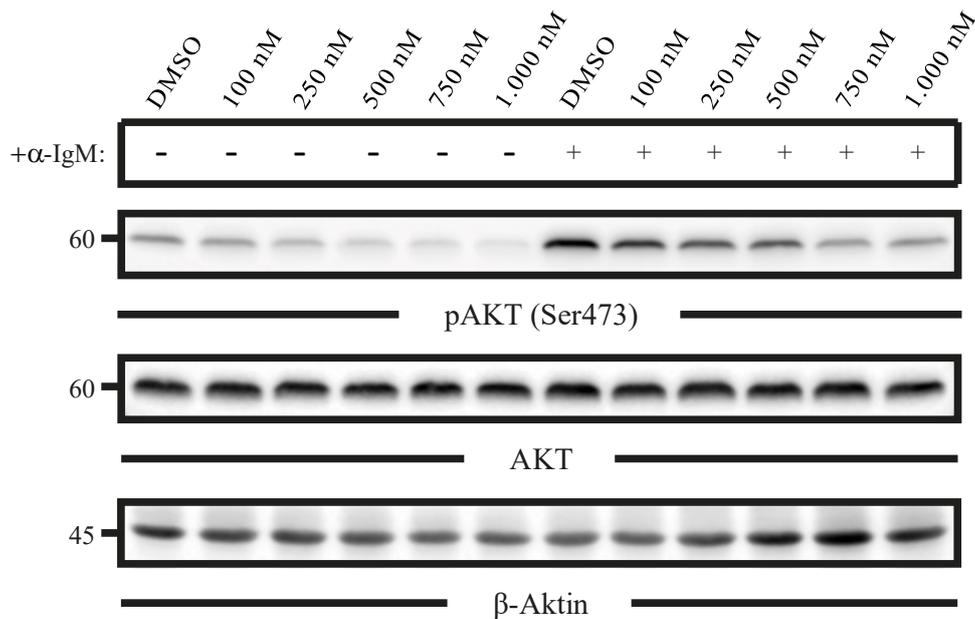
#### 4.1.1 Effekte der PI3K-Inhibition

Wie in der Einleitung bereits erläutert, spielt der PI3K-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptose und Proliferation von Zellen (siehe 1.1.3.2.1). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob die verwendeten Prä-B-Zellen von diesem Signalweg abhängig sind. Dazu wurde überprüft, ob der verwendete PI3K-Inhibitor spezifische Effekte auf das im Signalweg *downstream* der PI3K-Kinase vorkommende AKT ausübt.

##### 4.1.1.1 PI3K-Inhibition vermindert die Phosphorylierung von AKT.

Da AKT einen wichtigen Effektor im PI3K-Signalweg darstellt, wurden die Zellen für 1 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt, welcher an die Phosphosite Ser473 bindet. Es wurden die Inhibitorkonzentrationen 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM und 1.000 nM verwendet. Bevor die Zellen lysiert wurden, wurde der Prä-BZR bei der Hälfte der Zellen mit  $\alpha$ -IgM stimuliert.

In Abbildung 30 ist das Ergebnis der Titration des PI3K-Inhibitors dargestellt. Die PI3K-Inhibition führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Phosphorylierung von AKT. Die AKT-Bande diente dabei der direkten Normalisierung der Ergebnisse und zeigte, dass nur die Phosphorylierung von AKT abnahm und nicht die Menge an AKT selbst. Der Effekt trat sowohl bei den stimulierten als auch den unstimulierten Zellen auf, jedoch verstärkte die Stimulation des Prä-BZRs mittels  $\alpha$ -IgM bei allen Proben die Phosphorylierung von AKT.

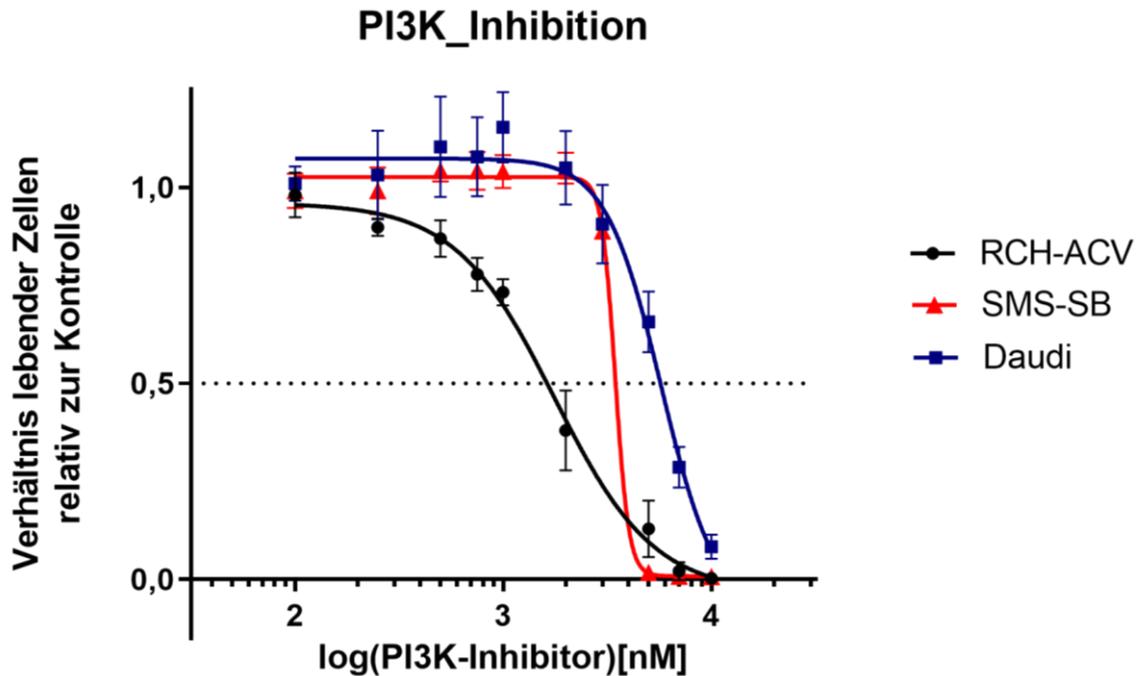


**Abbildung 30: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) bei PI3K-Inhibition bei RCH-ACV** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des niedermolekularen PI3K-Inhibitors LY294002 behandelt. Bei der Hälfte der Zellen wurde der Prä-BZR stimuliert und anschließend wurden alle Zellen lysiert. Die Auftragung erfolgte in aufsteigender Inhibitorkonzentration. Auf der linken Seite sind die unstimulierten Zellen als Kontrolle für die Stimulation des Prä-BZRs dargestellt. Der verwendete Antikörper bindet an die Phosphosite Ser473.  $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 3).

#### 4.1.1.2 RCH-ACV reagieren sensitiv auf PI3K-Inhibition.

Als Nächstes wurde untersucht, wie die Zellen auf die PI3K-Inhibition reagieren. Da für die Hemmung des PI3K-Signalwegs in anderen Zelllinien ein apoptotischer Effekt bereits beschrieben wurde<sup>30</sup>, wurden die RCH-ACV-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors behandelt. Nach 7 Tagen wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Annexin V und dem Viabilitätsmarker 7-AAD angefärbt und anschließend mittels Laser mit den Filtern G582\_15 und B695\_40 angeregt. Um die Sensitivität der RCH-ACV für die PI3K-Inhibition und somit ihre Abhängigkeit von diesem Signalweg besser einordnen zu können, wurde der Versuch gleichermaßen mit SMS-SB-Zellen durchgeführt, bei denen es sich ebenfalls um Prä-B-Zellen handelt. Außerdem wurde das Experiment auch mit Daudi-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Burkitt-Lymphomzellen, für die eine Abhängigkeit vom PI3K-Signalweg bereits beschrieben wurde.<sup>189</sup>

In Abbildung 31 ist die Viabilität der Zellen (in Prozent), normalisiert auf die Viabilität der Kontrolle, gegen die Konzentration des PI3K-Inhibitors (in nM) aufgetragen.



	RCH-ACV	SMS-SB	Daudi
<b>IC<sub>50</sub> [nM]</b>	1.767	3.455	5.754

**Abbildung 31: Überlebenskurve der RCH-ACV (schwarz), SMS-SB (rot) und Daudi (blau) nach PI3K-Inhibition** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors LY294002 behandelt. Nach 7 Tagen wurden ein Apoptose-Assay durchgeführt und die Zellen jeweils auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Da eine große Spanne an Inhibitorkonzentrationen verwendet wurde, erfolgte eine halblogarithmische Auftragung. Anhand der Schnittpunkte der Kurven mit der gestrichelten Linie bei 0,5 können die jeweiligen IC<sub>50</sub>-Konzentrationen berechnet werden. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte ± Standardabweichung an (n = 3).

Alle drei Zelllinien reagieren sensitiv auf den Inhibitor, was die sigmoidalen Kurvenverläufe zeigen. Die IC<sub>50</sub>-Werte geben die Inhibitorkonzentrationen an, bei denen die Hälfte der Zellen in Apoptose gegangen ist. Die RCH-ACV weisen im Vergleich zu den anderen betrachteten Zelllinien mit 1.767 nM einen geringen IC<sub>50</sub>-Wert auf und reagieren somit sehr sensitiv auf die PI3K-Inhibition. Die SMS-SB haben einen etwas höheren IC<sub>50</sub>-Wert von 3.455 nM, während bei den Burkitt-Lymphom-Zellen Daudi mehr als dreimal so hohe Inhibitorkonzentrationen verwendet werden müssen, damit die Hälfte der Zellen in Apoptose geht (5.754 nM). Mit den ermittelten logarithmischen IC<sub>50</sub>-Werten wurde ein ANOVA-

Test durchgeführt. Dieser ergab, dass sich die IC<sub>50</sub>-Werte der drei Zelllinien deutlich statistisch signifikant unterscheiden ( $p < 0,0001$ ).

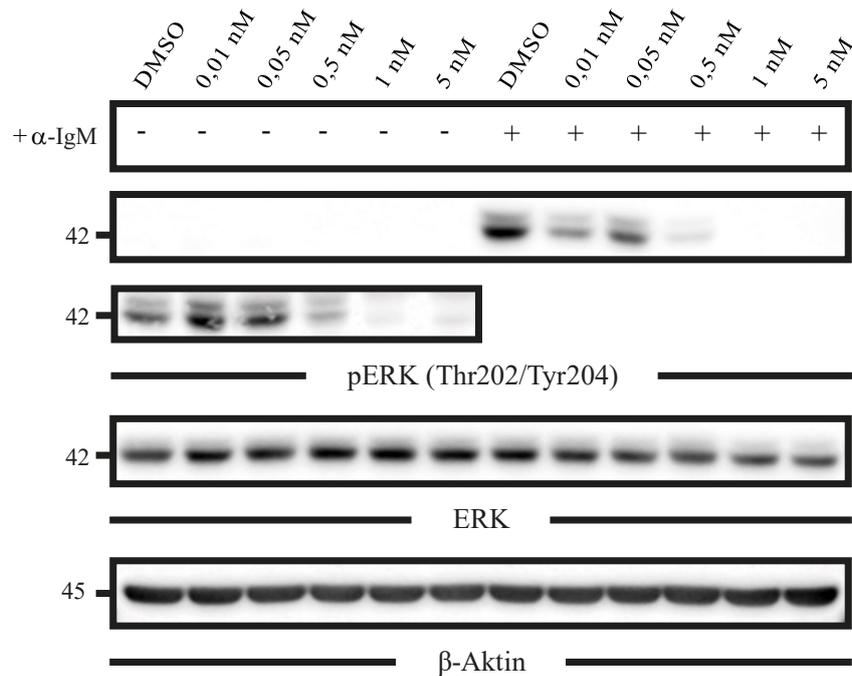
#### **4.1.2 Effekte der MEK-Inhibition**

Ein Effekt auf die Apoptoseeinleitung durch Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs ist in der Literatur bereits beschrieben worden.<sup>40</sup> Analog zur Analyse des PI3K-Signalwegs wurde daher nun untersucht, ob auch RCH-ACV von diesem Signalweg abhängig sind und ob sie nach MEK-Inhibition in Apoptose gehen. Zunächst wurden die spezifischen Effekte des verwendeten Inhibitors auf das im Signalweg *downstream* von MEK vorkommende ERK überprüft.

##### **4.1.2.1 MEK-Inhibition vermindert die Phosphorylierung von ERK.**

In der Literatur ist beschrieben, dass ERK einen wichtigen Effektor im MEK-Signalweg darstellt.<sup>40</sup> Daher wurde eine Titrationsreihe mit dem MEK-Inhibitor Trametinib durchgeführt, welcher an die Phosphosites Thr202 und Tyr204 bindet. Vorversuche zeigten, dass schon bei geringen Konzentrationen Effekte auf pERK sichtbar waren. Aus diesem Grund wurde der folgende Versuch mit den Inhibitorkonzentrationen 0,01 nM, 0,05 nM, 0,5 nM, 1 nM und 5 nM durchgeführt. Die Zellen wurden für 1 h mit dem MEK-Inhibitor inkubiert und es wurde eine Kontrolle mit dem gleichen Volumen an DMSO mitgezogen. Der Prä-BZR wurde bei der Hälfte der Zellen mit  $\alpha$ -IgM stimuliert, bevor im Anschluss alle Zellen lysiert wurden.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse des Western Blots mit der Trametinib-Titrationsreihe aufgetragen. Die Phosphorylierung von ERK nahm abhängig von der Konzentration von Trametinib ab. Zur Normalisierung des Signals wurde das unphosphorylierte ERK verwendet. Es zeigte, dass nur die Phosphorylierung von ERK abnahm und nicht die Menge an ERK selbst. Nach der erneuten Entwicklung des Bereichs mit den unstimulierten Proben durch das *Odyssey® Fc* konnte diese Phosphorylierungsabnahme auch schon basal festgestellt werden. Die Phosphorylierung von ERK wurde durch Stimulation des Prä-BZRs bei allen Proben verstärkt.



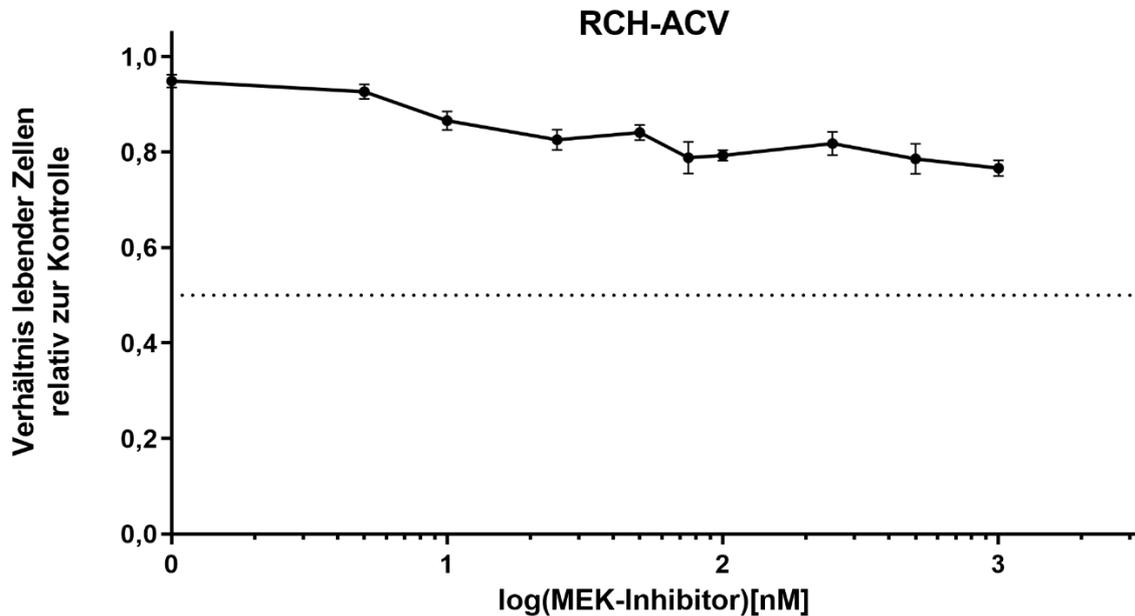
**Abbildung 32: Immunologische Darstellung von pERK (Thr202/Tyr204) nach MEK-Inhibition bei RCH-ACV** Die Zellen wurden für 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des MEK-Inhibitors Trametinib inkubiert. Anschließend wurde der Prä-BZR bei der Hälfte der Zellen stimuliert. Nachdem die Zellen lysiert worden waren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Auftragung erfolgte in aufsteigender InhibitorKonzentration. Auf der linken Seite sind zum Vergleich die unstimulierten Proben dargestellt. Nach der Entwicklung der gesamten Membran wurde der Teil mit den stimulierten Proben abgeschnitten und das basale pERK-Signal erneut detektiert. β-Aktin diente als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 3).

#### 4.1.2.2 RCH-ACV sind nicht abhängig vom MEK-Signalweg.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die RCH-ACV sensitiv auf die MEK-Inhibition reagieren. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des MEK-Inhibitors inkubiert. Nach 7 Tagen wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Es wurden wiederum die Laser mit den Filtern G582\_15 und B695\_40 verwendet und auf die viablen Zellen gegasst. Außerdem wurde eine DMSO-Kontrolle mitgezogen, auf die die viablen Zellen jeweils normalisiert wurden.

In Abbildung 33 ist das Verhältnis der lebenden Zellen normalisiert auf die Kontrolle in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration des MEK-Inhibitors (in nM) dargestellt. Die Zellen reagieren nicht sensitiv auf die MEK-Inhibition, da kein starker Abfall der Viabilität stattfand. Die Viabilität sank ab einer InhibitorKonzentration von 25 nM leicht auf etwa 80 % ab, jedoch konnte auch bei den höheren InhibitorKonzentrationen noch ein Großteil der Zellen überleben.

Der Kurvenverlauf präsentierte sich nicht sigmoidal, wie es bei sensitiven Zelllinien der Fall wäre. Somit konnte auch kein IC<sub>50</sub>-Wert für die MEK-Inhibition bestimmt werden.

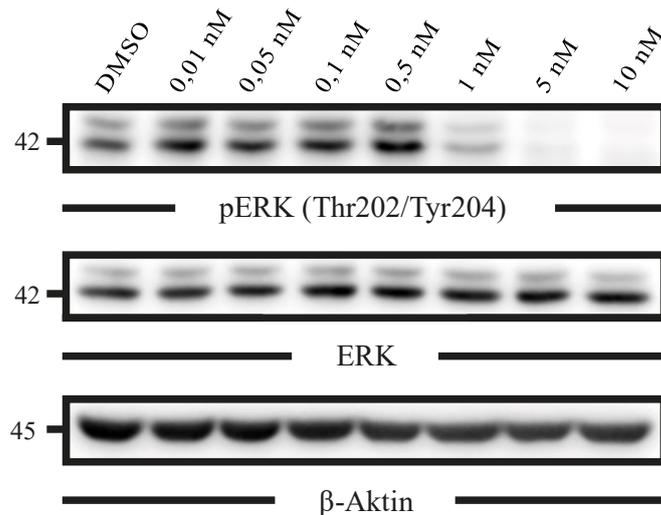


**Abbildung 33: Überlebenskurven der RCH-ACV nach MEK-Inhibition** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des MEK-Inhibitors Trametinib behandelt. Nach 7 Tagen wurden ein Apoptose-Assay durchgeführt und die ermittelten Werte auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Aufgrund der großen Spannweite an Konzentrationen wurde eine halblogarithmische Auftragung gewählt. Die gestrichelte Linie verdeutlicht visuell den Wert, bei dem 50 % der Zellen in Apoptose gehen würden, wenn es sich um eine sensitive Zelllinie handeln würde. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

#### 4.1.2.3 A375 sind vom MEK-Signalweg abhängig.

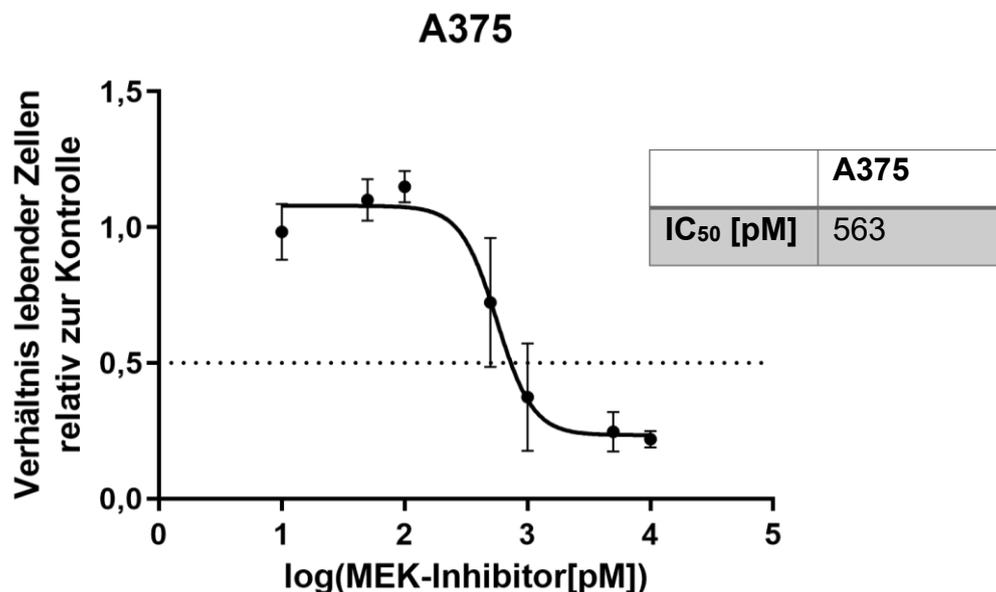
A375 sind Melanomzellen, für die eine Abhängigkeit von dem Ras-ERK-Signalweg in der Literatur bereits beschrieben wurde.<sup>36</sup> Diese Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet, da die RCH-ACV nicht sensitiv auf die MEK-Inhibition reagiert hatten.

Analog zu den Versuchen mit den RCH-ACV wurden wiederum ein Western Blot und ein Apoptose Assay durchgeführt. Es wurden folgende Inhibitorkonzentrationen verwendet: 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM und 10 nM. In dieser Zelllinie kam es schon bei niedrigen Konzentrationen des MEK-Inhibitors Trametinib (ab 1 nM) zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Phosphorylierung von ERK (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Immunologische Darstellung von pERK bei MEK-Inhibition bei A375** Die A375-Zellen wurden für 1 h mit dem MEK-Inhibitor Trametinib behandelt. Anschließend wurden sie lysiert und es wurde ein Western Blot durchgeführt.  $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 2).

Außerdem verdeutlichte der Apoptose-Assay, dass die A375 sensitiv auf die MEK-Inhibition reagieren, was am sigmoidalen Verlauf der Kurve erkennbar war (Abbildung 35). Der niedrige  $IC_{50}$ -Wert von 563 pM zeigte, dass die Zellen schon bei geringen Inhibitor-Konzentrationen in Apoptose gehen.



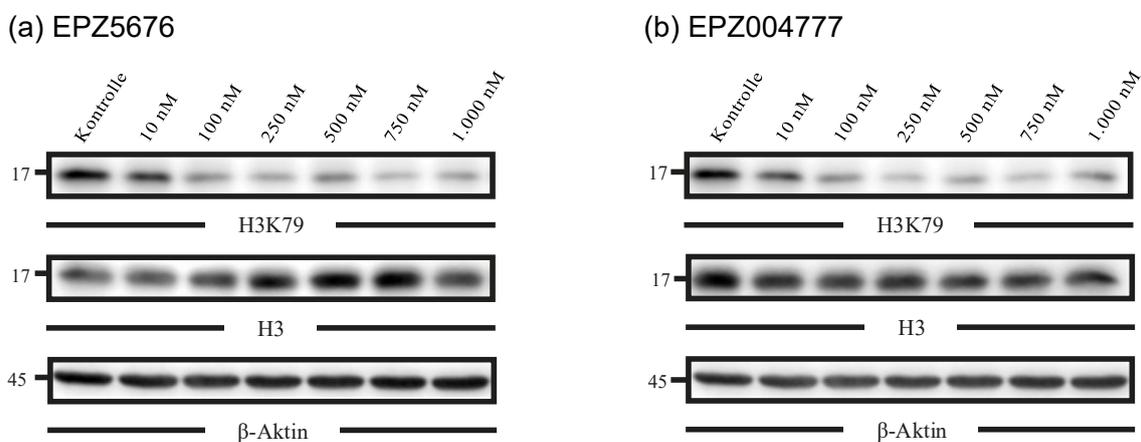
**Abbildung 35: Überlebenskurve der A375 nach MEK-Inhibition** Die A375 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des MEK-Inhibitors Trametinib behandelt. Nach 7 Tagen wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Die gestrichelte Linie bei 0,5 verdeutlicht visuell den Wert, bei dem 50 % der Zellen in Apoptose gehen. Es ergibt sich ein  $IC_{50}$ -Wert von 563 pM für Trametinib bei A375. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an (n = 3).

## 4.2 DOT1L-Inhibition bei RCH-ACV

In unserer Arbeitsgruppe fiel bei der SYK-Inhibition in RCH-ACV bei der massenspektrometrischen Analyse mittels gPome die Hochregulation der DOT1L-Phosphorylierung am Serinrest 1349 auf. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass DOT1L als Histonmethyltransferase für einige wichtige zelluläre Prozesse wie Genexpression und Zellzyklusprogression bedeutsam ist. Außerdem ist seine relevante Rolle bei der Entstehung von Mixed-Lineage-Leukämien bereits publiziert worden.<sup>114</sup> Somit stellt DOT1L ein potenziell interessantes Target *downstream* des Prä-BZR dar.

### 4.2.1 DOT1L-Inhibition verringert die Methylierung von H3K79.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden die Prä-B-Zellen RCH-ACV mit den DOT1L-Inhibitoren EPZ5676 (Pinometostat) und EPZ004777 behandelt. Es wurden folgende Konzentrationen verwendet: 10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM und 1.000 nM. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurden als Kontrolle RCH-ACV verwendet, zu denen DMSO im gleichen Volumenanteil wie die Inhibitoren zugegeben wurde.



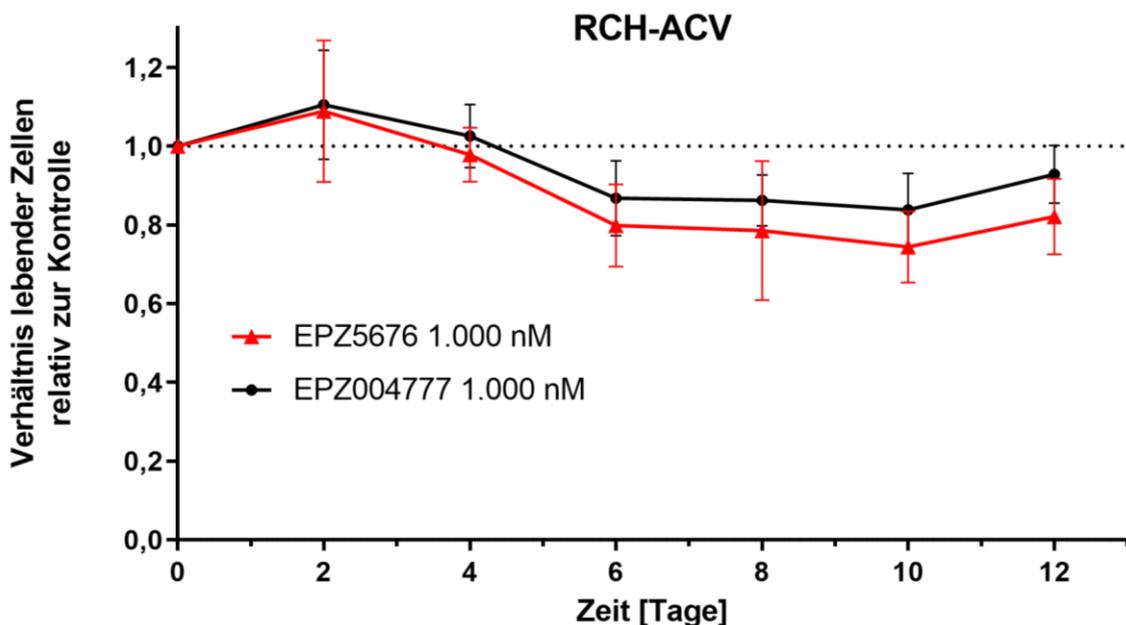
**Abbildung 36: Immunologische Detektion von H3K79 nach DOT1L-Inhibition bei RCH-ACV**  
(a) Es sind die Zellen dargestellt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitor EPZ5676 behandelt wurden. (b) Der Inhibitor EPZ004777 wurde verwendet.  $\beta$ -Aktin diene als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots (n = 4).

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine Inhibition von DOT1L zur Abnahme der Methylierung von Histonen führt.<sup>115</sup> Dies konnte in den RCH-ACV bestätigt werden: In Abbildung 36a wurde der Inhibitor EPZ5676 verwendet, in Abbildung 36b EPZ004777. Der Blot auf das unmethylierte Histon H3 diene

hierbei der Normalisierung der Ergebnisse und verdeutlichte, dass nur die Methylierung der Histone reguliert war und nicht die Menge an Histon H3 selbst. Die Abnahme der Phosphorylierung erfolgte linear zur Steigerung der Konzentration der Inhibitoren.

#### 4.2.2 RCH-ACV zeigen keine Abhängigkeit von DOT1L

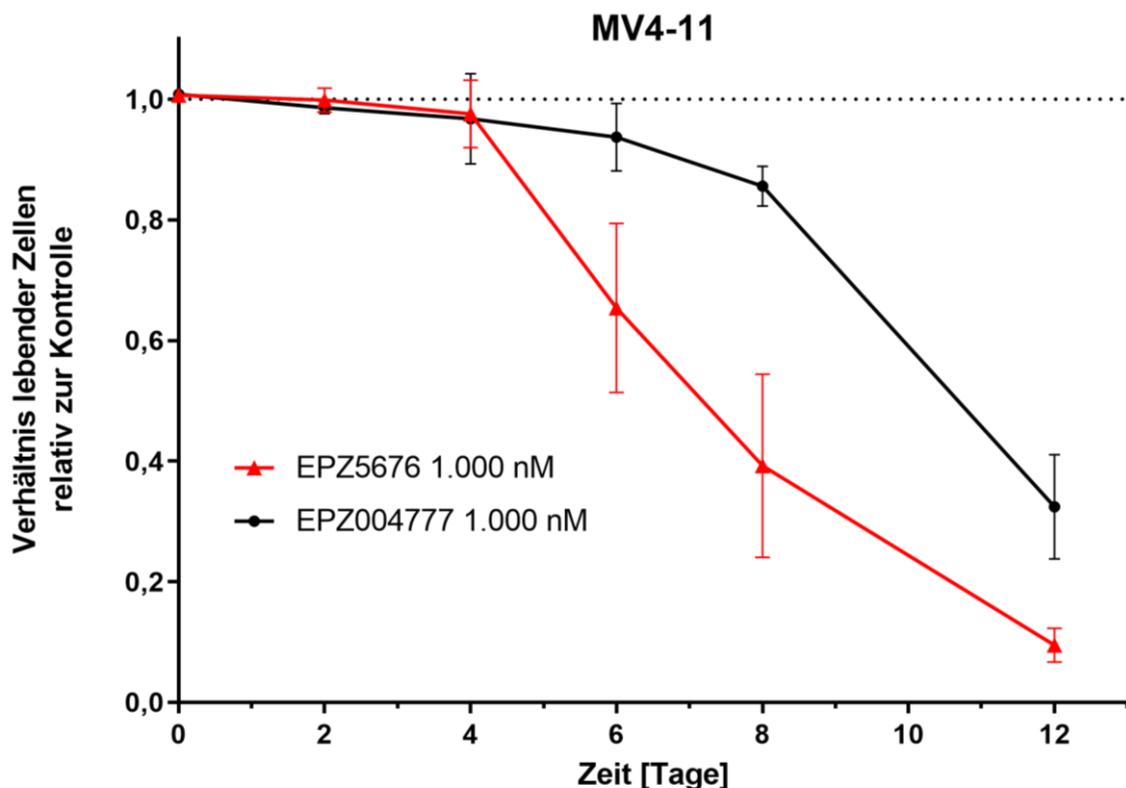
Um einen apoptotischen Effekt der DOT1L-Inhibition zu zeigen, wurden die RCH-ACV für 12 Tage mit den DOT1L-Inhibitoren EPZ5676 (Pinometostat) und EPZ004777 in einer Konzentration von 1.000 nM behandelt. Als Kontrolle wurde wiederum DMSO verwendet. Alle 2 Tage wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt, bei dem die viablen Zellen detektiert wurden.



**Abbildung 37: Apoptose-Assay der RCH-ACV nach DOT1L-Inhibition** Mit den DOT1L-inhibierten RCH-ACV wurde alle 2 Tage ein Apoptose-Assay durchgeführt. Ihre Viabilität wurde auf diejenige der Kontrollzellen normalisiert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und mit frischem Medium versorgt. Die Inhibitoren wurden ebenfalls in der jeweiligen Konzentration zugegeben. Der Verlauf der viablen Zellen wurde anschließend über einen Zeitraum von 12 Tagen dargestellt. Die gestrichelte Linie bei 1,0 gibt den Verlauf der Werte an, bei dem die Viabilität der Zellen (normalisiert auf die Kontrolle) konstant bleiben würde. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

In Abbildung 37 ist das Verhältnis der lebenden Zellen relativ zur Kontrolle in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf (in Tagen) dargestellt. RCH-ACV reagieren nicht sensitiv auf die DOT1L-Inhibition, da die Viabilität der Prä-B-Zellen an Tag 6 bei etwa 80 % lag (normalisiert auf die Kontrolle). Auch im weiteren Verlauf fand kein stärkerer Abfall statt.

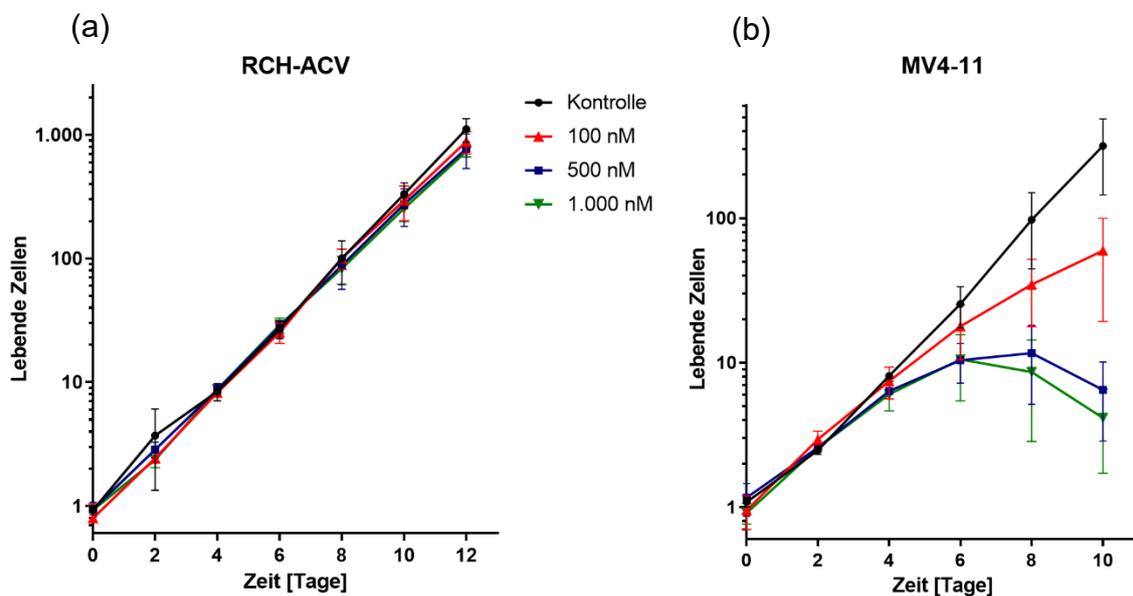
Außerdem wurde der Versuch ebenfalls mit den akuten monozytischen Leukämie-Zellen MV4-11 durchgeführt, für die in der Literatur bereits ein apoptotischer Effekt der DOT1L-Inhibition beschrieben wurde.<sup>115,190</sup> Dieser Effekt konnte mit den MV4-11 reproduziert werden (Abbildung 38): Die DOT1L-Inhibition führte zu einem deutlichen Viabilitätsabfall bis auf etwa 25 % nach 12 Tagen. Um zu untersuchen, ob dieser Abfall der Anzahl viabler Zellen bei den MV4-11 signifikant größer war als bei den RCH-ACV, wurden die ermittelten Werte logarithmiert. Anschließend wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es zeigte sich ein deutlich signifikanter Unterschied:  $p = 0.0002$  bei Verwendung des Inhibitors EPZ5676 und  $p = 0.0021$  bei dem Inhibitor EPZ004777.



**Abbildung 38: Apoptose-Assay der MV4-11 nach DOT1L-Inhibition** Mit den DOT1L-inhibierten MV4-11 wurde alle 2 Tage ein Apoptose-Assay durchgeführt. Die Viabilität der Zellen wurde auf diejenige der Kontrollzellen normalisiert. Die gestrichelte Linie bei 1,0 gibt den Verlauf der Werte an, bei dem die Viabilität der Zellen konstant bleiben würde. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

Es war auffällig, dass der Inhibitor EPZ5676 sowohl bei den MV4-11 als auch bei den RCH-ACV einen stärkeren apoptotischen Effekt zeigte als der Inhibitor EPZ004777. Diese Beobachtungen sind kohärent zu der in der Literatur beschriebenen höheren Potenz von EPZ5676 im Vergleich zu EPZ004777.<sup>115</sup>

Da die DOT1L-Inhibition keinen apoptotischen Effekt auf die RCH-ACV-Zellen gezeigt hatte, wurde nun mithilfe einer Zellzählung untersucht, ob die DOT1L-Inhibition möglicherweise einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat. Dazu wurden die Zellen mit EPZ5676 in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM und 1.000 nM behandelt. Alle 2 Tage wurde die Zellzahl bestimmt. Außerdem wurde wieder eine DMSO-Kontrolle mitgezogen. Nach jedem Zählvorgang wurden die Zellen gesplittet und die Gesamtzellzahl für jeden Tag nach der bei 3.2.1.3 beschriebenen Formel berechnet. In Abbildung 39 ist das Wachstumsverhalten von RCH-ACV (a) und MV4-11 (b) dargestellt.



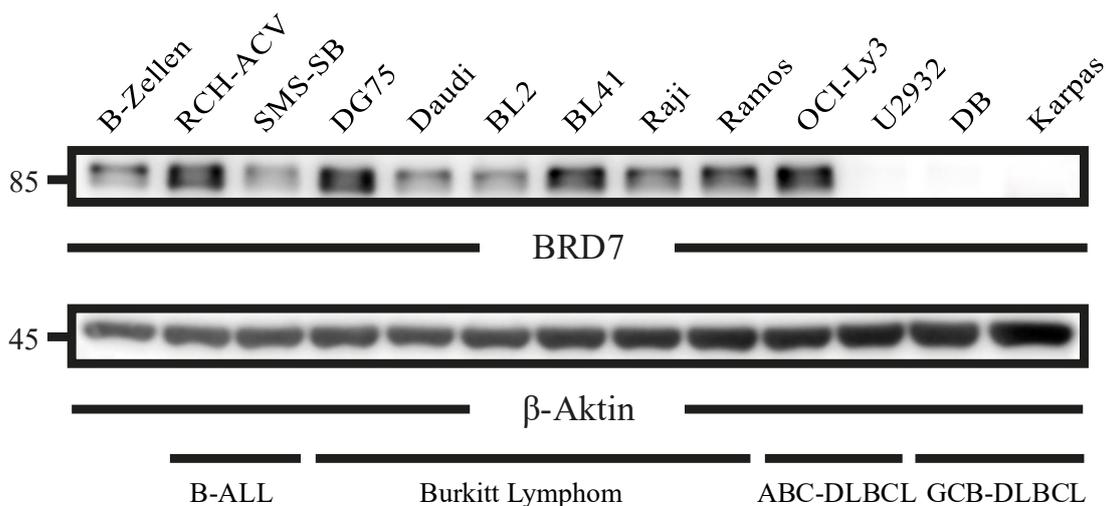
**Abbildung 39: Wachstumsverhalten der RCH-ACV (a) und MV4-11 (b) unter DOT1L-Inhibition** Die Zellen wurden mit dem DOT1L-Inhibitor EPZ5676 behandelt und alle 2 Tage gezählt, wobei auf die Gesamtzellzahl zurückgerechnet wurde. Auf der Abszissenachse sind die Tage aufgetragen. Da die Zellen ein exponentielles Wachstum zeigen, ist die berechnete Gesamtzahl der lebenden Zellen in logarithmischer Skala auf der Ordinatenachse aufgetragen. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

Bei den RCH-ACV zeigten sich keine antiproliferativen Effekte, da sich die mit dem Inhibitor behandelten Zellen nahezu identisch wie die Kontrollzellen verhielten und sie somit kaum in ihrem exponentiellen Wachstum eingeschränkt waren. Im Gegensatz dazu sah man bei den MV4-11 einen klaren konzentrationsabhängigen Rückgang des Wachstums und bei den höheren Konzentrationen ab Tag 6 sogar eine Abnahme der Zellzahl. Diese Effekte sind deutlich statistisch signifikant (100 nM:  $p = 0.0436$ ; 500 nM:  $p = 0.0012$ ; 1000 nM:  $p = 0.0006$ ).

### 4.3 BRD7-Expression in unterschiedlichen Zelllinien

Neben DOT1L präsentierte sich in der massenspektrometrischen Untersuchung das Regulatorprotein BRD7 als potenziell interessantes Target im Prä-BZR-Signalweg. BRD7 zeigte nach 1 h SYK-Inhibition ein verstärktes Phosphorylierungsniveau seines Serinrests an Position 237. Die Bedeutung von BRD7 als Tumorsuppressor ist in einigen Tumorentitäten bereits beschrieben worden<sup>128</sup> und sollte nun in den Prä-B-Zellen RCH-ACV genauer studiert werden.

Um einen Überblick über das Vorkommen von BRD7 in unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen zu erhalten, wurde ein Western Blot mit den verschiedenen Tumorzelllinien B-ALL, Burkitt-Lymphom und Untergruppen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (ABC-DLBCL und GCB-DLBCL) durchgeführt. Außerdem wurden naive B-Zellen, die ein Teil des Immunsystems des Menschen darstellen und Ursprung der genannten Tumorentitäten sind, aufgetragen.



**Abbildung 40: Immunologische Darstellung von BRD7 in verschiedenen Zelllinien**  
 Verschiedene Tumorzelllinien sowie naive B-Zellen wurden aufgetragen und das Ausmaß der BRD7-Expression detektiert. Im unteren Bereich ist gekennzeichnet, zu welchen Tumorentitäten die einzelnen Zelllinien gehören.  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben ( $n = 1$ ).

In Abbildung 40 ist das Ausmaß der BRD7-Expression in den unterschiedlichen Zelllinien dargestellt. BRD7 wird in vielen Tumorentitäten wie B-ALL und Burkitt-Lymphomen exprimiert. In den hier betrachteten GCB-DLBCL DB und Karpas sowie in den ABC-DLBCL U2932 scheint BRD7 herunterreguliert zu sein. Außerdem scheint BRD7 in den RCH-ACV mehr exprimiert zu werden als in

SMS-SB-Zellen, welche ebenfalls Prä-B-Zellen darstellen.<sup>191</sup> Auch in naiven B-Zellen ist das Ausmaß der BRD7-Expression geringer als in RCH-ACV.

#### 4.4 Induzierbare BRD7-Überexpression

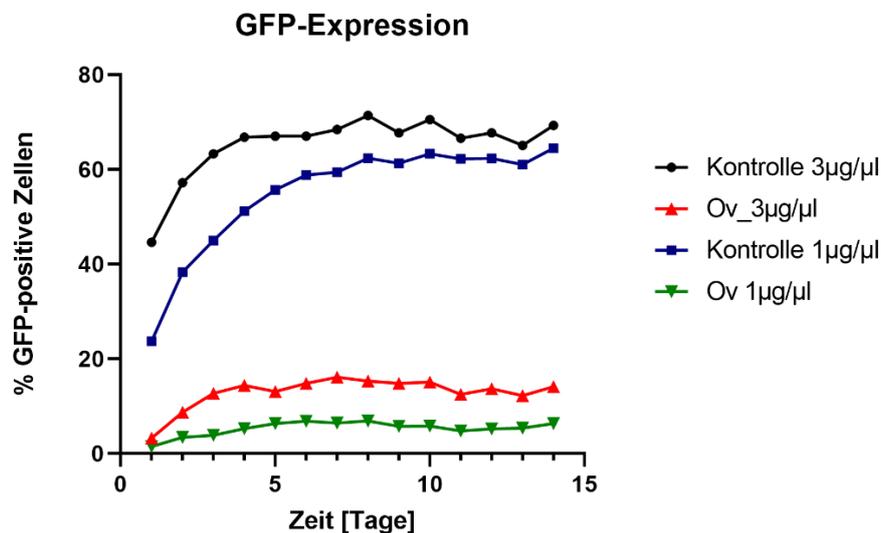
Zur Untersuchung der Rolle des Tumorsuppressors BRD7 in den Prä-B-Zellen RCH-ACV wurde ein Vektor kloniert, der für eine Überexpression von BRD7 kodiert und durch Doxycyclin induzierbar ist.

##### 4.4.1 Klonierung der induzierbaren BRD7-Überexpression

Der für die BRD7-Überexpression kodierende DNA-Abschnitt wurde zunächst aus einem MSCV-N-term HA-Flag puro-BRD7-Vektor von *Addgene* herausamplifiziert und in den Doxycyclin-induzierbaren LT3-GECIR-Vektor einkloniert (siehe 3.2.3.1). Als Kontrollvektor wurde der GECIR-empty-Vektor verwendet.

##### 4.4.2 Zusammenhang BRD7-Überexpression und GFP-Expression

Nach der Klonierung wurde in Vorversuchen festgestellt, dass sich nur ein sehr kleiner Prozentsatz der Zellen induzieren ließ (Abbildung 41).

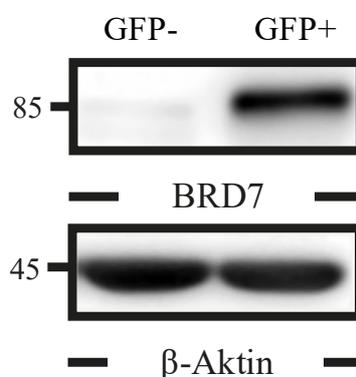


**Abbildung 41: Prozentsatz der GFP-positiven RCH-ACV-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen** Die BRD7-Überexpressionszellen („Ov“) sowie die RCH-ACV-Kontrollzellen wurden mit 1 µg/µl und mit 3 µg/µl Doxycyclin behandelt. Jeden Tag wurde die Induktionsrate mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n = 1).

Die Kontrollzellen sowie die BRD7-Überexpressionszellen wurden mit Doxycyclin induziert. Um zu überprüfen, ob unterschiedliche Doxycyclin-Konzentrationen die GFP-Expression erhöhen, wurde das Experiment mit 1 µg/µl und mit 3 µg/µl durchgeführt. Die GFP-Expression wurde täglich mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die BRD7-Überexpressionszellen exprimierten signifikant weniger GFP als die Kontrollzellen und auch im weiteren zeitlichen Verlauf fand kein großer Anstieg statt. Bei Verwendung von 3 µg/µl Doxycyclin ließen sich nur etwa 14 % der Überexpressionszellen induzieren, während die Kontrollzellen mit 3 µg/µl Doxycyclin Induktionsraten von ca. 70 % erreichten.

Um die Notwendigkeit eines Sortiervorgangs bei den BRD7-überexprimierenden Zellen darzustellen, wurden die GFP-positiven und die GFP-negativen Zellen 48 h nach Induktion heraussortiert. Sie wurden lysiert, bevor im Anschluss ein Western Blot durchgeführt wurde.

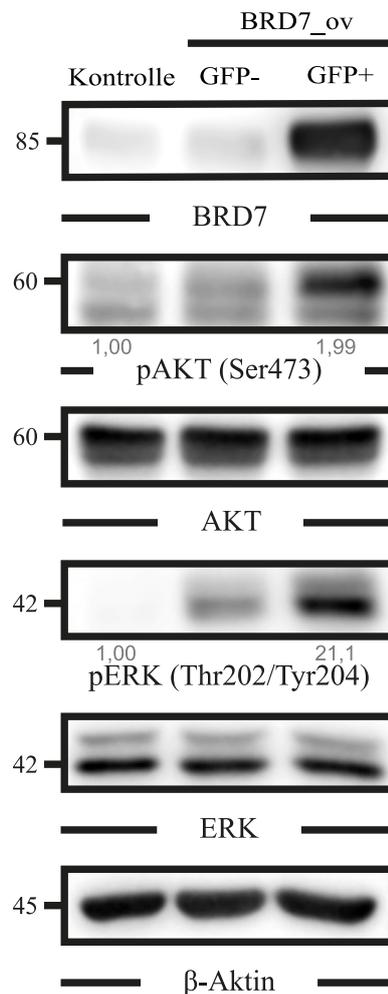
Die BRD7-Überexpression korreliert mit der GFP-Expression (Abbildung 42). Aus diesem Grund waren bei den nachfolgenden Experimenten Sortierungen auf die GFP-positiven Zellen notwendig. Auch wenn sich die Kontrollzellen besser induzieren ließen, wurden diese ebenfalls vor jedem Versuch sortiert, um gleiche Bedingungen für beide Konditionen herzustellen. Da in den GFP-negativen Zellen kaum BRD7 nachgewiesen wird, kann mit diesem Experiment außerdem gezeigt werden, dass die Verwendung des induzierbaren Vektors zur deutlichen Überexpression von BRD7 führt. Die Überexpression bei den sortierten Zellen ist deutlich statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 42: Korrelation GFP-Expression und BRD7-Überexpression bei RCH-ACV** Die Zellen wurden induziert und die GFP-exprimierenden sowie die GFP-negativen Zellen nach 48 h heraussortiert. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. β-Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Es ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt (n = 2).

#### 4.4.3 pAKT und pERK sinken erst nach 14 Tagen.

Im nächsten Schritt wurden die Effekte der BRD7-Überexpression auf die Signalwege des Prä-BZRs untersucht. Die Überexpressionszellen sowie die Kontrollzellen wurden induziert und nach 48 h sortiert. Dabei wurden die Überexpressionszellen wiederum auf die GFP-negativen und die GFP-positiven Zellen gesortet, um den Zusammenhang zwischen GFP-Positivität und den resultierenden Effekten der BRD7-Überexpression zu untersuchen. Die Zellen wurden lysiert und es wurde ein Western Blot durchgeführt.

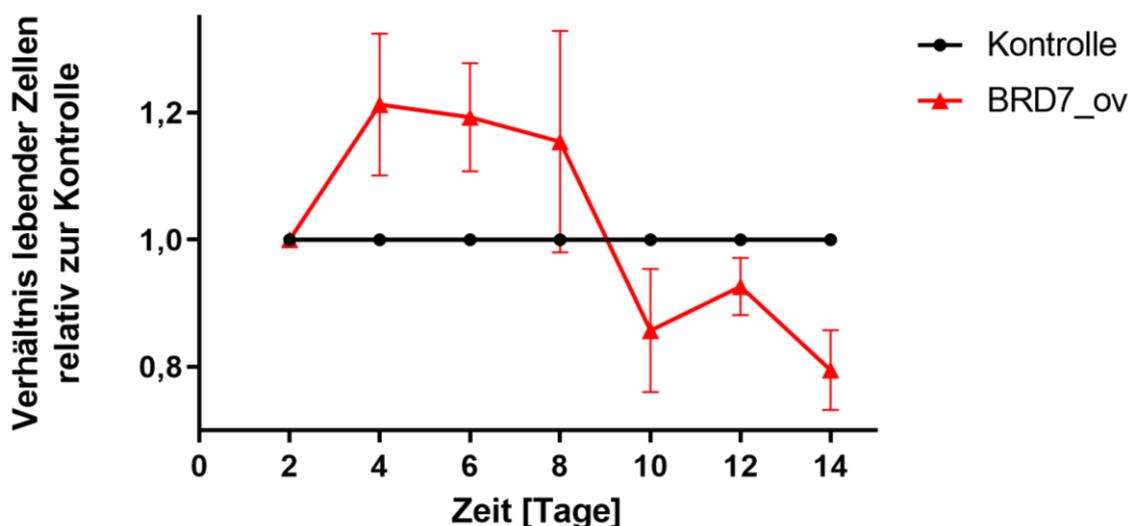


**Abbildung 43: Immunologische Detektion von pAKT (Ser473) und pERK (Thr202/Tyr204) bei BRD7-Überexpression nach 48 Stunden** Die RCH-ACV-Zellen wurden induziert und nach 48 h sortiert. Bei den Kontrollzellen wurden nur die GFP-positiven Zellen herausgesortet, während bei den Überexpressionszellen auch auf die GFP-negativen Zellen gesortet wurde. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem GECIR-empty-Vektor transduziert worden waren. Der verwendete pAKT-Antikörper bindet an die Phosphosite Ser473 – der pERK-Antikörper an Thr202 und Tyr204. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben das bei den GFP-positiven BRD7-Überexpressionszellen mittels Quantifizierung ermittelte Ausmaß der Phosphorylierungssteigerung im Vergleich zu den Kontrollzellen an. Als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist auf der linken Seite der Banden in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 2).

Nach 48 h Induktion wurde BRD7 deutlich überexprimiert (Abbildung 43). Die Blots auf AKT und ERK dienten der Normalisierung und verdeutlichten, dass nur die Phosphorylierung reguliert wurde und nicht die Menge der Proteine selbst. Die Phosphorylierungen von AKT und ERK stiegen im Vergleich zu den Kontrollzellen an. Die GFP-negativen BRD7-Überexpressionszellen zeigten diese Veränderungen nicht.

Dieser Phosphorylierungsanstieg widerspricht unseren Erwartungen, dass die Überexpression von BRD7 die proliferationsfördernden PI3K- und ERK-Signalwege hemmen müsste und man somit von einer Abnahme der Phosphorylierungen von AKT und ERK ausgehen würde.

Um zu untersuchen, welche Effekte auf das Proliferationsverhalten der BRD7-Überexpressionszellen diese Beobachtungen zur Folge haben, wurde als Nächstes ein Wettbewerbsassay durchgeführt: Die Kontrollzellen und die Überexpressionszellen wurden induziert und 1:1 mit Wildtyp-Zellen gemischt. Alle 2 Tage wurde der Prozentsatz der GFP-exprimierenden Zellen detektiert. In Abbildung 44 ist das Verhältnis der lebenden Zellen relativ zur Kontrolle gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Der Anteil der GFP-exprimierenden Zellen stieg zunächst – in Bezug zur Kontrolle – an. Etwa ab Tag 9 fand ein Abfall bis auf ca. 80 % des Kontrollwertes statt.

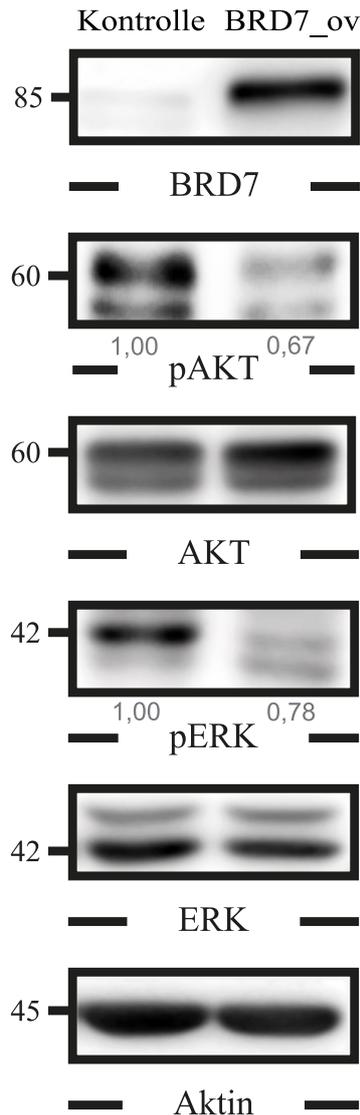


**Abbildung 44: Wettbewerbsassay mit unsortierten BRD7-Überexpressionszellen (BRD7\_ov)** Die RCH-ACV-Zellen wurden jeweils mit Wildtypzellen gemischt und induziert. Alle 2 Tage wurde ein Wettbewerbsassay durchgeführt, bei dem die GFP-positiven Zellen detektiert wurden. Die Werte wurden dann zu den Werten der Kontrollzellen in Relation gesetzt und auf den GFP-Ausgangswert (Tag 2) normalisiert. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an (n = 3).

Diese Beobachtungen ließen uns die Hypothese aufstellen, dass die BRD7-überexprimierenden Zellen zunächst einen Wachstumsvorteil gegenüber den Kontrollzellen besitzen. Dies wäre auch kohärent zu dem gesteigerten Phosphorylierungsverhalten von AKT und ERK nach 48 h Induktion (siehe Abbildung 43). Erst ab etwa Tag 9 verloren die Zellen ihren Wachstumsvorteil und verhielten sich so, wie man es unter der Annahme eines Tumorsuppressor-Phänotyps erwarten würde: Die Zellen proliferierten weniger stark als die Kontrollzellen.

Um den Verlauf der Regulation der Signalwege zu untersuchen und zu überprüfen, ob wir den im Kompetitionsassay im weiteren zeitlichen Verlauf auftretenden Proliferationsnachteil auf Signaling-Ebene verifizieren können, wurde der Western Blot nach 14 Tagen Induktion wiederholt. Die GFP-positiven Zellen wurden nach 14 Tagen heraussortiert und lysiert. Anschließend wurde mit den BRD7-Überexpressionszellen und den Kontrollzellen ein Western Blot durchgeführt. Nach 14 Tagen Induktion trat eine starke BRD7-Überexpression auf (Abbildung 45). Außerdem war in den Überexpressionszellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ein erniedrigtes Level an pAKT und pERK detektierbar. AKT und ERK dienten hierbei der Normalisierung. Die in *grau* dargestellten Zahlenwerte quantifizieren diese Phosphorylierungsabnahme.

Das Experiment wurde einmal nach 14 Tagen und einmal nach 10 Tagen Induktion durchgeführt. Auch nach 10 Tagen sah man einen Abfall der Phosphorylierungen von AKT und ERK. Betrachtet man die Ergebnisse dieser beiden Experimente gemeinsam, ergibt sich für AKT ein p-Wert von 0.1200 und für ERK ein p-Wert von 0.0299. Somit ist die Reduktion der Phosphorylierung bei ERK statistisch signifikant, bei AKT nicht. Wichtig ist jedoch zu beachten, dass diese beiden Experimente nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit durchgeführt wurden und daher nicht komplett vergleichbar sind. Außerdem handelt es sich nur um eine sehr kleine Stichprobe ( $n = 2$ ).



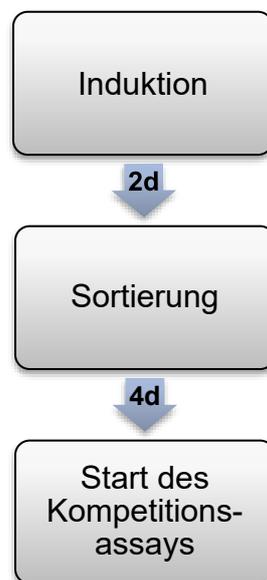
**Abbildung 45: Immunologische Detektion von pAKT und pERK bei induzierbarer BRD7-Überexpression nach 14 Tagen** Die RCH-ACV-Zellen wurden induziert und die GFP-positiven Zellen nach 14 Tagen herausortiert. Anschließend wurden sie lysiert, bevor ein Western Blot durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit einem GECIR-empty-Vektor transduziert worden waren. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben die bei den BRD7-Überexpressionszellen mittels einer Quantifizierung ermittelte Reduktion der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollsequenz an.  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 2).

#### 4.4.4 BRD7-überexprimierende Zellen zeigen einen Wachstumsnachteil im Kompetitionsassay.

Wie bereits bei 4.4.2 erläutert, war es notwendig, vor jedem Experiment die Zellen zu sortieren, damit nur die Effekte der BRD7-überexprimierenden Zellen betrachtet wurden. Somit konnte der Kompetitionsassay erst nach einigen Tagen Induktion gestartet werden, da sich die Zellen nach dem Sortiervorgang zunächst

erholen mussten. Dass bei einem vorherigen Versuch (siehe 4.4.3) festgestellt wurde, dass die BRD7-überexprimierenden Zellen zunächst einen Wachstumsnachteil besitzen, musste ebenfalls bei der Auswertung beachtet werden.

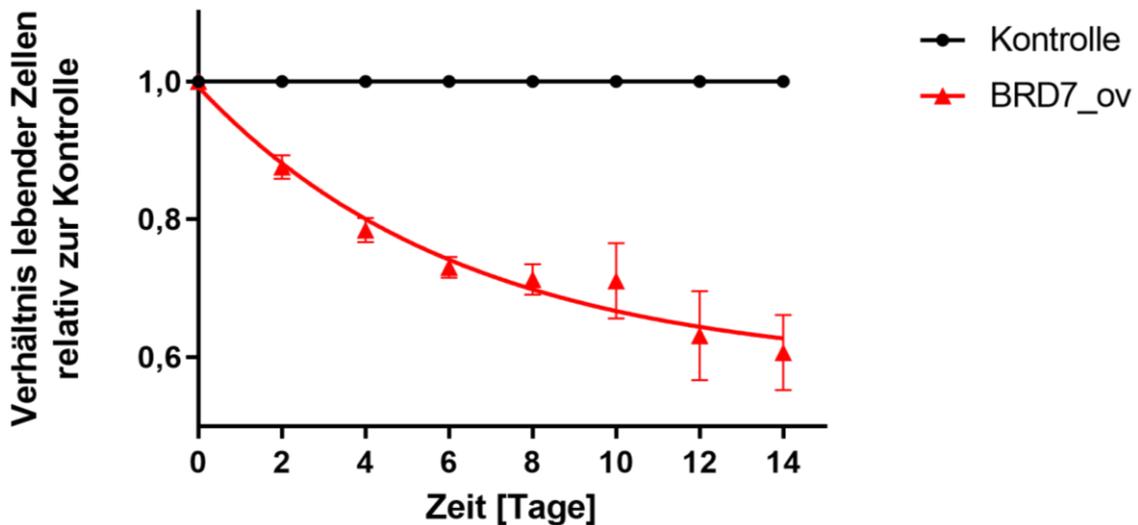
Bei beiden Ansätzen wurden die GFP-exprimierenden Zellen alle 2 Tage detektiert. Als Kontrollzellen wurden Zellen verwendet, die mit einem GECIR-empty-Vektor transduziert worden waren. Tag 0 im Wettbewerbsassay entsprach hierbei Tag 6 nach Induktion. In Abbildung 46 ist das Vorgehen bei diesem Experiment schematisch dargestellt.



**Abbildung 46: Schematische Darstellung des Vorgehens bei diesem Wettbewerbsassay**  
Die RCH-ACV-Zellen wurden zunächst mit 3 µg/µl Doxycyclin (1:1.000) induziert. Nach 2 Tagen wurden die GFP-positiven Zellen heraussortiert. 4 Tage später wurde der Wettbewerbsassay gestartet. Der Prozentsatz der Überexpressionszellen wurde auf die Kontrollzellen normalisiert.

In Abbildung 47 ist das Verhältnis der viablen BRD7-Überexpressionszellen relativ zu den lebenden Kontrollzellen dargestellt und gegen den zeitlichen Verlauf (in Tagen) aufgetragen. Am stetigen Abfall der Kurve ist erkennbar, dass die BRD7-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen einen Wachstumsnachteil aufwiesen. Nach 14 Tagen waren im Mittel noch 60,7 % der BRD7-überexprimierenden Zellen – im Vergleich zur Kontrolle – vorhanden.

Diese Unterschiede sind statistisch sehr signifikant ( $p = 0.0006$ ).

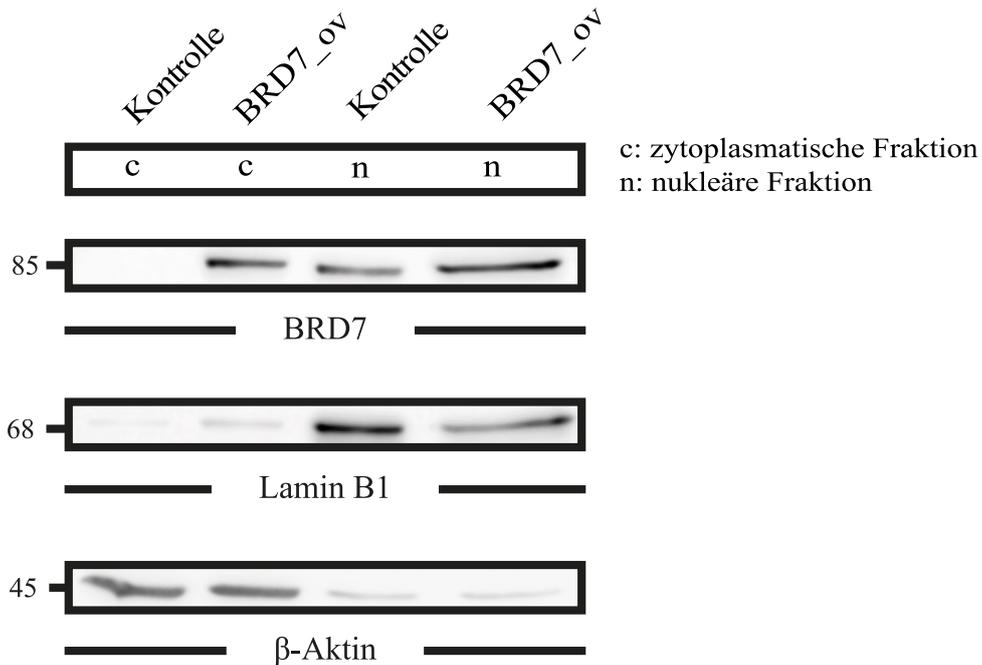


**Abbildung 47: Wettbewerbsassay mit den induzierten BRD7-Überexpressionszellen**  
 Nachdem die RCH-ACV-Zellen induziert worden waren, wurden die GFP-positiven Zellen nach 48 h herausortiert. Der Wettbewerbsassay wurde am 6. Tag nach Induktion gestartet und die ermittelten GFP-Werte wurden jeweils auf die Kontrollwerte und auf den Ausgangswert (Tag 0) normalisiert. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

#### 4.4.5 Von induzierbarem Vektor kodiertes, überexprimiertes BRD7 ist im Nukleus und im Cytoplasma lokalisiert.

Als Nächstes wurde die BRD7-Überexpression, die von dem induzierbaren Vektor kodiert wird, genauer charakterisiert. Dazu wurde untersucht in welchem Zellkompartiment BRD7 nach Transduktion mit diesem Vektor nachgewiesen werden kann.

Auch für dieses Experiment wurden die Zellen vorher sortiert. Direkt im Anschluss wurde eine Fraktionierung durchgeführt, in dem das *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* Kit von *Thermo Fisher Scientific* nach Herstellerangaben verwendet wurde. Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse der Fraktionierung der Zellen, die mit dem induzierbaren BRD7-Überexpressionsvektor transduziert worden waren. Das überexprimierte BRD7 war sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vorhanden. BRD7 aus den Kontrollzellen befand sich hingegen nur im Nukleus.

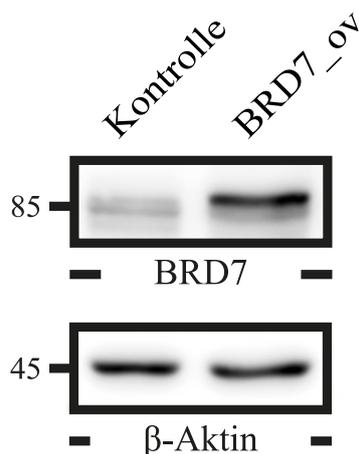


**Abbildung 48: Immunologische Darstellung der Lokalisation von BRD7 bei der induzierbaren BRD7-Überexpression** Die RCH-ACV-Überexpressionszellen und die Kontrollzellen wurden fraktioniert. Auf der linken Seite ist die zytoplasmatische, rechts die nukleäre Fraktion aufgetragen. Da Lamin B1 nur im Nukleus vorkommt, konnte es als Beladungskontrolle für die nukleäre Fraktion verwendet werden. Das zytoplasmatische  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle für die zytoplasmatische Fraktion. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. (n = 1).

#### 4.5 Konstitutive BRD7-Überexpression (MSCV N-term HA-Flag puro BRD7)

Da sich die mit dem induzierbaren GECIR-Vektor transduzierten Zellen – wie in Abbildung 41 gezeigt – nur zu einem sehr geringen Prozentsatz induzieren ließen, wurden einige Experimente zur Bestätigung der gewonnenen Daten zusätzlich in einem anderen Vektorsystem durchgeführt. Dazu wurde der MSCV N-term HA-Flag puro BRD7 von *Addgene* verwendet, der die BRD7-Sequenz bereits enthielt und sie konstitutiv exprimierte.

Um die BRD7-Überexpression zu bestätigen, erfolgte eine Lyse der Kontrollzellen und der Zellen, die konstitutiv die BRD7-Überexpression exprimieren. Im Anschluss wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem ein primärer Antikörper verwendet wurde, der gegen BRD7 gerichtet ist. Die Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven BRD7-Überexpressionsvektor transduziert worden waren, exprimierten deutlich mehr BRD7 als die Kontrollzellen (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Immunologische Darstellung der konstitutiv BRD7-überexprimierenden RCH-ACV-Zellen (BRD7\_ov) im Vergleich zu den Kontrollzellen** Die RCH-ACV-Zellen wurden lysiert und es wurde ein Western Blot durchgeführt. Als Kontrolle dienen Wildtyp-Zellen und als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist auf der linken Seite in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 10).

Außerdem wurde das Ausmaß der BRD7-Überexpression mithilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt. Dazu wurde zunächst RNA isoliert und diese dann mithilfe von DNase verdaut und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit der cDNA eine qPCR durchgeführt und damit auf die Menge an BRD7-mRNA zurückgerechnet, welche in den Überexpressionszellen gebildet worden war.

Zellen	Primer	Schwellenwert Ct
Kontrolle	BRD7	24,55
Kontrolle	BRD7	24,88
Kontrolle	BRD7	24,48
BRD7_ov	BRD7	22,54
BRD7_ov	BRD7	22,42
BRD7_ov	BRD7	22,66
Kontrolle	$\beta$ -Aktin	20,79
Kontrolle	$\beta$ -Aktin	20,93
Kontrolle	$\beta$ -Aktin	20,29
BRD7_ov	$\beta$ -Aktin	19,87

Zellen	Primer	Schwellenwert Ct
BRD7_ov	β-Aktin	19,85
BRD7_ov	β-Aktin	19,53

**Tabelle 32: Detektierte Schwellenwerte bei der qPCR in Abhängigkeit von den verwendeten Zellen und Primern**

Der Schwellenwert Ct (*cycle threshold*) gibt hierbei den Replikationszyklus an, bei dem das exponentielle Wachstum der Kurve beginnt (siehe Tabelle 32). Somit ist er direkt proportional zur Menge an vorhandenen BRD7.

Mittelwert  $\mu$  und Standardabweichung  $\sigma$  der Ct-Werte:

Zellen	Primer	Mittelwert $\mu$	Standardabweichung $\sigma$
Kontrolle	BRD7	24,64	0,17
BRD7_ov	BRD7	22,54	0,10
Kontrolle	β-Aktin	20,67	0,27
BRD7_ov	β-Aktin	19,75	0,16

**Tabelle 33: Errechnete Mittelwerte und Standardabweichungen bei der qPCR**

Die relative Expression E berechnet sich nach dem *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR 1* von *Applied Biosystems*<sup>177</sup> zu (siehe 3.2.4.4.1):

$$E = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2,26$$

Das bedeutet, dass in den Überexpressionszellen etwas mehr als doppelt so viel BRD7 exprimiert wird als in den Kontrollzellen.

Um zu ermitteln, wie sehr die Messwerte bei dieser dreimaligen Messung voneinander abweichen, erfolgte die Berechnung der Standardabweichung der relativen Expression unter Einbeziehung von Tabelle 33. Die verwendeten Formeln sind in 3.2.4.4.1 angegeben.

Die Standardabweichung von  $\Delta\Delta Ct$  ist somit:

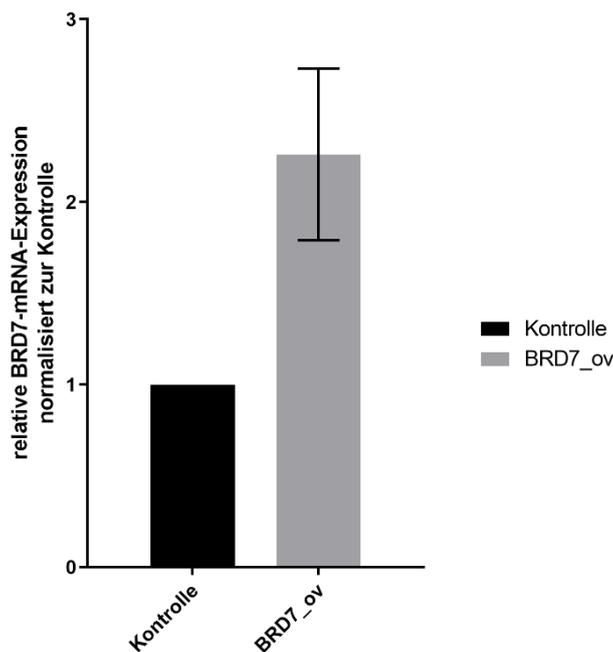
$$\sigma_{\Delta\Delta Ct}^2 = 0,14$$

Die Standardabweichung des gesamten Terms berechnet sich zu:

$$\sigma_E^2 = 0,22$$

$$\sigma_E = 0,47$$

In Abbildung 50 ist die relative Expression der BRD7-mRNA in den Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven BRD7-Überexpressionsvektor transduziert worden waren, normalisiert auf die Kontrolle dargestellt.



**Abbildung 50: BRD7-mRNA-Expression in den BRD7-Überexpressionszellen und in den Kontrollzellen** Es wurde die RNA der RCH-ACV-Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Dann wurde die Menge an BRD7 mittels qPCR quantifiziert, wobei  $\beta$ -Aktin als interne Kontrolle diente. Das Ausmaß an BRD7-cDNA in den Überexpressionszellen, welches proportional zur BRD7-mRNA-Expression ist, wurde dann auf die Expressionsmenge in den Kontrollzellen normalisiert und der errechnete Mittelwert angegeben. Die berechnete Standardabweichung in den BRD7-Überexpressionszellen ist anhand des Fehlerbalkens dargestellt (n = 3).

#### 4.5.1 Untersuchungen mit Stimulation der BRD7-Überexpressionszellen

Phosphorylierungen von Enzymen bedeuten meistens eine Änderung in ihrem Aktivitätsniveau wie eine Hemmung oder eine Aktivierung. Dies wurde bereits 1955 von Fisher und Krebs erläutert.<sup>192</sup> In der Literatur ist beschrieben, dass die Aktivierung des PI3K-Signalwegs über Phosphorylierung von AKT zu gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose führt.<sup>30</sup> Außerdem wurde publiziert, dass die Aktivierung von ERK zum Großteil antiapoptotisch wirkt, es

jedoch unter gewissen Bedingungen auch zur Einleitung der Apoptose kommen kann.<sup>41</sup>

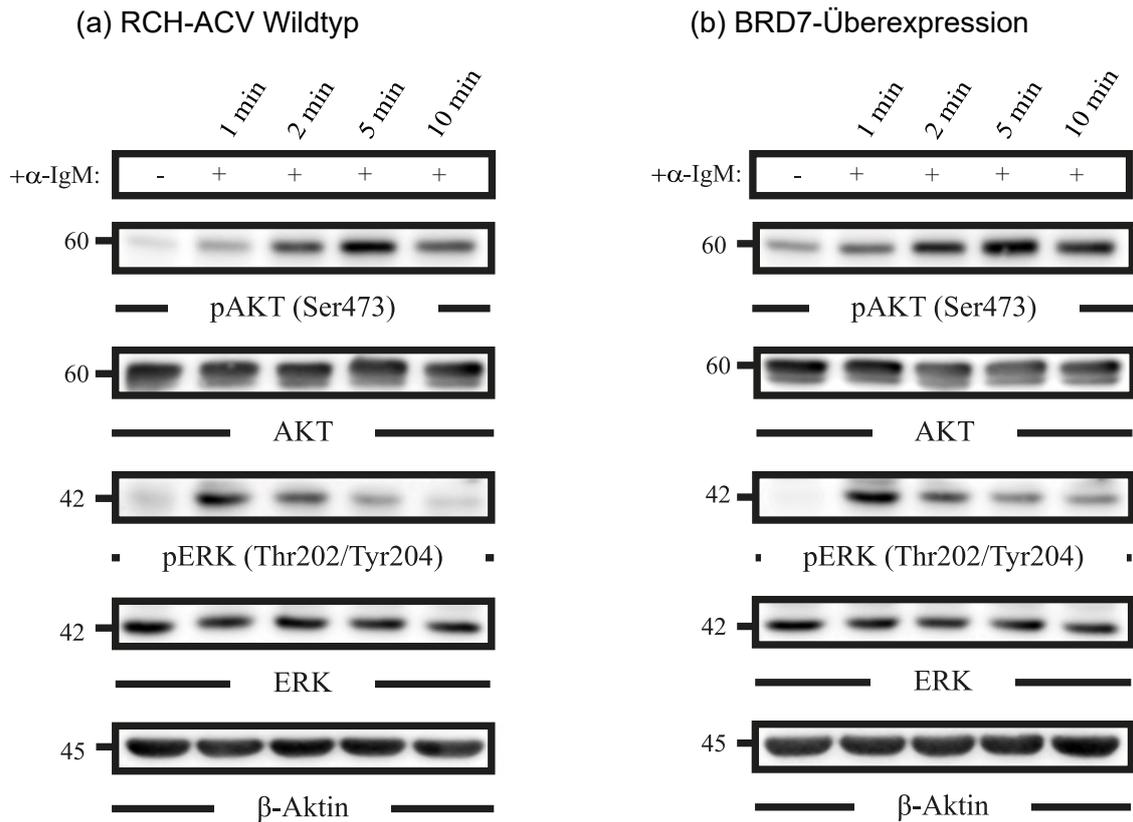
#### **4.5.1.1 Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Stimulationszeiten**

Im Folgenden wurden insbesondere die Effekte der BRD7-Überexpression auf die Phosphorylierung von AKT und ERK untersucht. Dazu wurde der Prä-BZR mit  $\alpha$ -IgM (human) stimuliert. Um Effekte auf die Phosphorylierungen zeigen zu können, wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, der die Stimulationszeiten ermitteln sollte, bei denen die Phosphorylierungen von AKT und ERK – und damit die zugehörigen Signalwege – am stärksten angeregt wurden.

Der Versuch wurde mit Wildtyp- und BRD7-Überexpressionszellen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst in serumfreies Medium überführt. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen unterschiedlich lange stimuliert. Die zu untersuchenden Zeiträume waren 1 min, 2 min, 5 min und 10 min nach Stimulation. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der die Zellen nicht stimuliert wurden. Anschließend wurden die Proben lysiert und es wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem der Verlauf der Phosphorylierungen von AKT und ERK untersucht wurde.

In Abbildung 51a sind die RCH-ACV-Wildtyp- und in Abbildung 51b die BRD7-Überexpressionszellen aufgetragen. Die AKT- und ERK-Signale dienen der Normalisierung und verdeutlichen, dass die Menge an basalem AKT bzw. ERK konstant bleibt. Bei den Wildtyp-Zellen nahm die Stärke des pAKT-Signals mit der Zeit zu und erreichte nach 5 min sein Maximum. Nach 10 min nahm die Signalstärke wieder ab. Das stärkste pERK-Signal trat hingegen direkt nach 1 min Stimulation auf. Längere Stimulationszeiten bewirkten wieder eine Abnahme des Signals. Die BRD7-Überexpressionszellen verhielten sich in Bezug auf den Verlauf der Phosphorylierungen von AKT und ERK genauso wie die Wildtyp-Zellen. Sie zeigten ebenfalls das stärkste pAKT-Signal nach 5 min und das stärkste pERK-Signal nach 1 min.

Die so ermittelten Stimulationszeiten, bei denen das stärkste Ausmaß der Phosphorylierungen detektiert wurde, wurden nun bei den folgenden Versuchen verwendet.



**Abbildung 51: Immunologische Darstellung einiger Effektoren nach unterschiedlichen Stimulationszeiten** Die RCH-ACV-Wildtypzellen (a) und die BRD7-Überexpressionszellen (b) wurden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend unterschiedlich lange stimuliert. Mithilfe eines Western Blots wurde nun der Verlauf der Phosphorylierungen von AKT (Ser473) und ERK (Thr202/Tyr204) analysiert. AKT und ERK dienen der Normalisierung, β-Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots (n = 3).

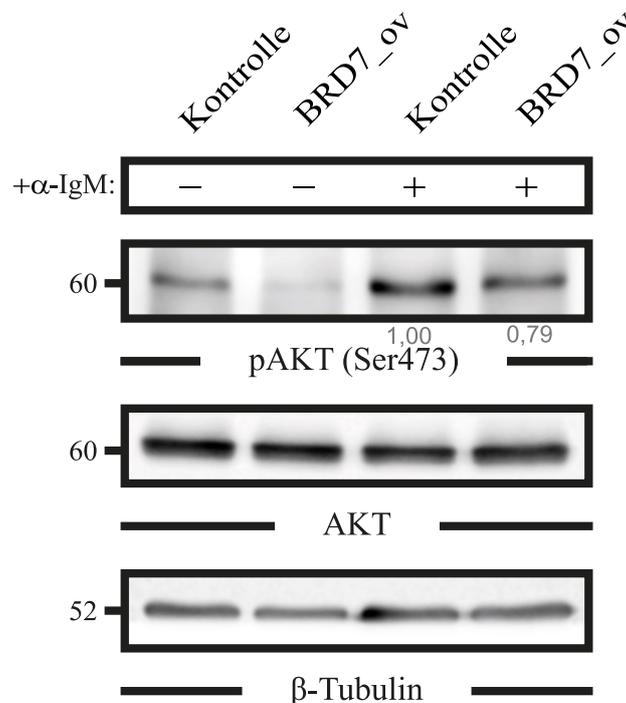
#### 4.5.1.2 BRD7-Überexpression führt zur Abnahme der Phosphorylierung von AKT.

Nun wurde untersucht, ob der Einfluss der BRD7-Überexpression auf die Phosphorylierung von AKT, wie er bereits mit der induzierbaren BRD7-Überexpression gezeigt wurde, in dem konstitutiv aktiven Vektorsystem bestätigt werden konnte.

Dazu wurden die Prä-BZR der Zellen für 5 min mit α-IgM stimuliert, da dies den stärksten Effekt auf pAKT gezeigt hatte (siehe 4.5.1.1). In Abbildung 52 sind die Ergebnisse des Western Blots mit den stimulierten und unstimulierten Zellen dargestellt. Die Überexpression von BRD7 führte zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt war

sowohl bei den stimulierten Zellen als auch schon basal erkennbar. Zur Normalisierung wurde der Blot auf AKT verwendet.

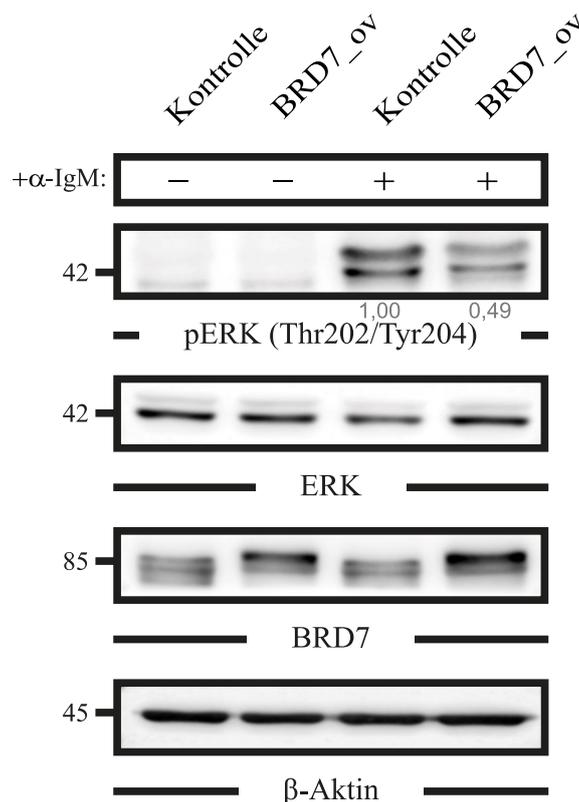
Somit konnten die Ergebnisse, die mit dem induzierbaren Vektorsystem gewonnen wurden, bestätigt werden. Zur Quantifizierung des pAKT-Signals wurde die Software *ImageJ* verwendet. Die Signalstärke des pAKTs wurde gemessen und anschließend durch die Signalstärke des jeweiligen AKT-Signals geteilt. Dann wurde der so ermittelte Wert der BRD7-Überexpressionszellen auf den Wert der Kontrolle normalisiert. Es zeigt sich, dass das pAKT-Signal bei den BRD7-Überexpressionszellen nur 0,79-mal so stark wie bei den Kontrollzellen ist. Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen ( $n = 3$ ) sind diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant ( $p = 0,0677$ ).



**Abbildung 52: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) bei RCH-ACV-Zellen mit konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression** Die konstitutiv BRD7-überexprimierenden Zellen und die Kontrollzellen wurden stimuliert. Anschließend wurden sie lysiert und es wurde ein Western Blot durchgeführt. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben das mittels einer Quantifizierung ermittelte Ausmaß der Phosphorylierungsreduktion bei den BRD7-Überexpressionszellen im Vergleich zur Kontrollsequenz an.  $\beta$ -Tubulin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. In der Abbildung ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt ( $n = 3$ ).

#### 4.5.1.3 BRD7-Überexpression führt zur Abnahme der Phosphorylierung von ERK.

Anschließend sollten auch die Effekte auf pERK bestätigt werden. Dazu wurden die Zellen für 1 min mit  $\alpha$ -IgM stimuliert, da dies den stärksten Effekt auf pERK gezeigt hatte (siehe 4.5.1.1). Die Überexpression von BRD7 bewirkte eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von ERK im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 53). Zur Normalisierung wurde der Blot auf ERK betrachtet. Hier war der Effekt nur bei den stimulierten Zellen sichtbar, da das basale Level an pERK auch bei den Kontrollzellen zu gering gewesen ist, um Veränderungen festzustellen. Analog zum Blot auf AKT (siehe 4.5.1.2) wurde eine Quantifizierung durchgeführt. Das pERK-Signal ist bei den BRD7-Überexpressionszellen 0,49-mal so stark wie bei den Kontrollzellen. Dieser Rückgang der Phosphorylierung ist statistisch signifikant ( $p = 0,0438$ ).

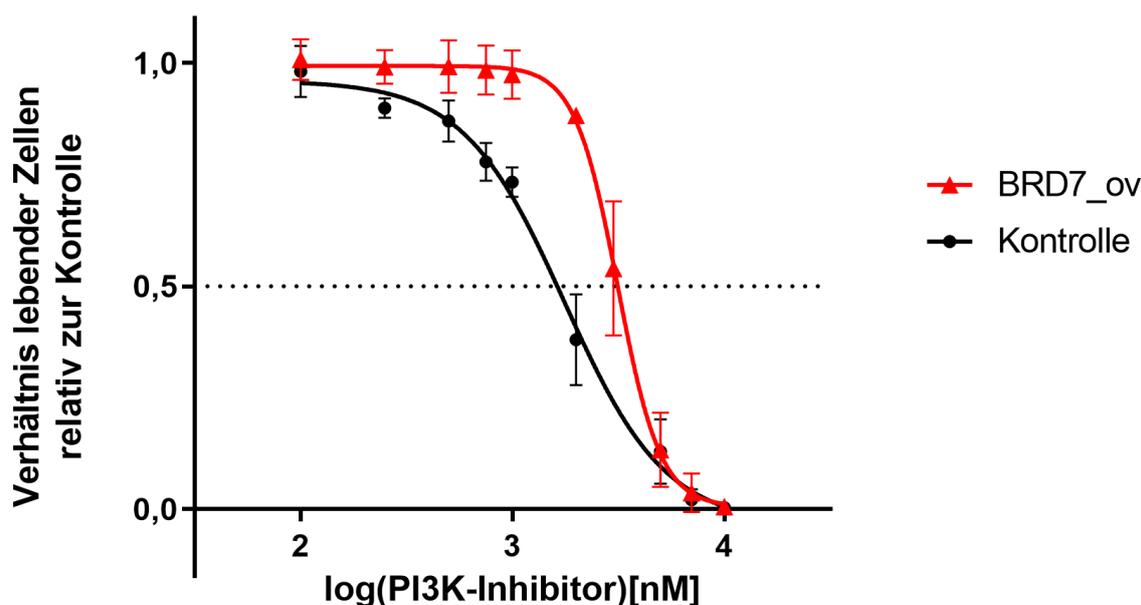


**Abbildung 53: Immunologische Darstellung von pERK (Thr202/Tyr204) bei den RCH-ACV-Zellen mit konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen** Die Hälfte der BRD7-Überexpressionszellen und der Kontrollzellen wurde stimuliert. Danach wurden alle Zellen lysiert, bevor im Anschluss ein Western Blot durchgeführt wurde. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben das mittels einer Quantifizierung ermittelte Ausmaß der Phosphorylierungsreduktion bei den BRD7-Überexpressionszellen im Vergleich zur Kontrollsequenz an.  $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Auf der linken Seite ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot ( $n = 2$ ).

Diese Beobachtungen in Bezug auf eine verstärkte Phosphorylierung von ERK bei BRD7-Überexpressionszellen sind wiederum kohärent zu den Ergebnissen bei den Experimenten mit der induzierbaren BRD7-Überexpression.

#### 4.5.2 BRD7-überexprimierende Zellen reagieren weniger sensitiv auf PI3K-Inhibition.

Wie in 4.5.1.2 gezeigt, führt die Überexpression von BRD7 zu einem erniedrigten pAKT-Level in den Zellen. Aus diesem Grund wurde nun untersucht, welchen Einfluss eine Inhibition des PI3K-Signalwegs auf RCH-ACV hat, in denen dieser Signalweg bereits herunterreguliert ist. Dazu wurde der in 4.1.1.2 beschriebene Apoptose-Assay auch mit den konstitutiv BRD7-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Die Auftragung erfolgte ebenfalls analog wie oben beschrieben. Zum direkten Vergleich wurden zusätzlich die Kontrollzellen dargestellt.



	Kontrolle	BRD7_ov
IC <sub>50</sub> [nM]	1.767	3.145

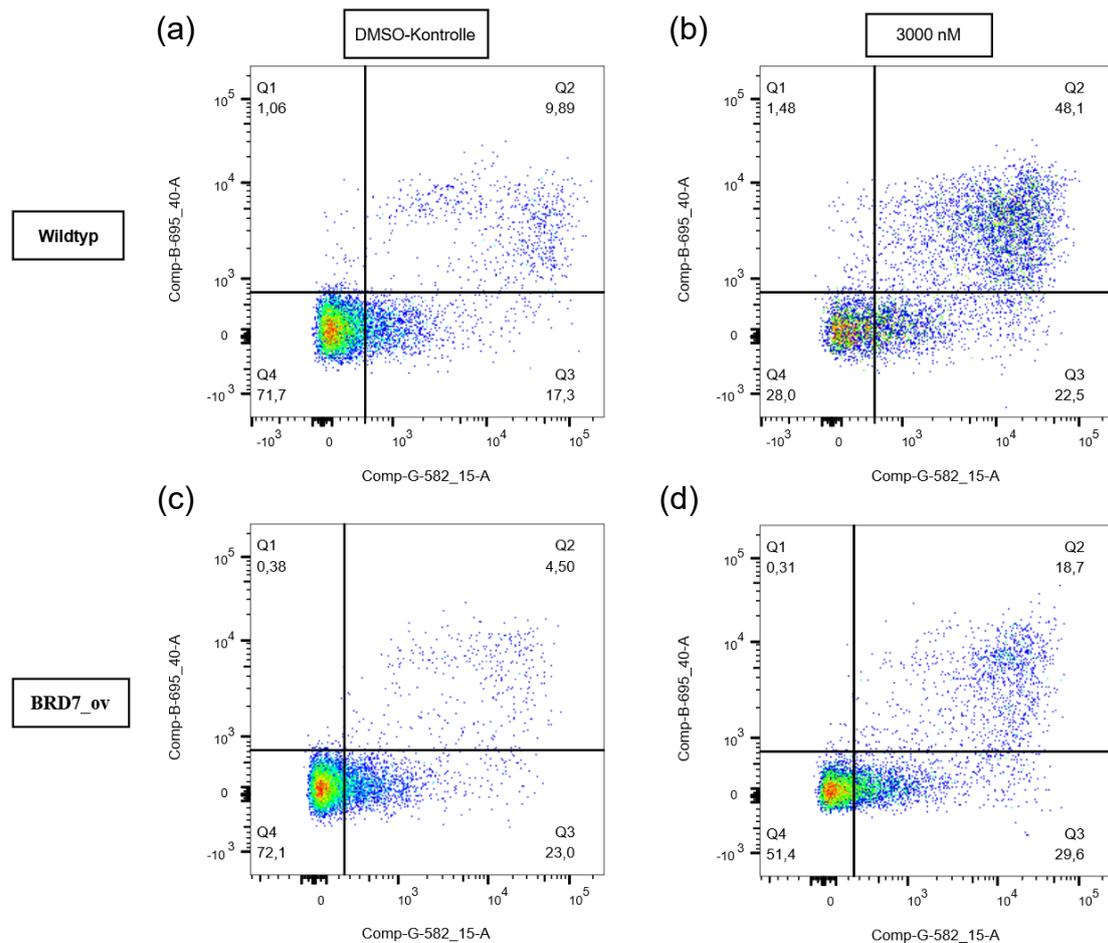
**Abbildung 54: Überlebenskurven der BRD7-Überexpressionszellen und der RCH-ACV-Kontrollzellen nach PI3K-Inhibition** Die Zellen wurden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. Nach 7 Tagen wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Es erfolgte eine halblogarithmische Auftragung. Anhand der Schnittpunkte der Kurven mit der gestrichelten Linie bei 0,5 können die jeweiligen IC<sub>50</sub>-Konzentrationen berechnet werden. Als Kontrolle dienten RCH-ACV-Wildtypzellen. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte ± Standardabweichung an (n = 3).

In Abbildung 54 ist das Verhältnis der lebenden Zellen relativ zur Kontrolle gegen die Konzentration des verwendeten PI3K-Inhibitors (in nM) aufgetragen. Der sigmoidale Verlauf der Kurve zeigt, dass auch die BRD7-überexprimierenden Zellen sensitiv auf die PI3K-Inhibition reagierten. Der Viabilitätsabfall fand jedoch erst bei höheren Konzentrationen statt. Dies verdeutlichte auch der höhere IC<sub>50</sub>-Wert von 3.145 nM im Vergleich zum IC<sub>50</sub>-Wert von 1.767 nM bei den Kontrollzellen. Dieser Unterschied in den logIC<sub>50</sub>-Werten ist statistisch signifikant (p = 0.001).

In Abbildung 55 sind die mittels der Software BD FACSDIVA™ gewonnenen Ergebnisse der in Abbildung 54 beschriebenen durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Auf der Abszissenachse ist die Anregbarkeit der Zellen mit dem gelbgrünen Laser mit dem G582\_15-Filter aufgetragen; die Ordinatenachse stellt die Anregbarkeit mit dem blauen Laser mit dem B695\_40-Filter dar. Somit trennt die vertikale Linie die Annexin V-positiven von den Annexin V-negativen Zellen; die horizontale Linie trennt die 7-AAD-positiven von den 7-AAD-negativen Zellen. Viable Zellen sind somit weder Annexin V- noch 7-AAD-positiv und befinden sich im linken unteren Quadranten (Q4). Gehen die Zellen in Apoptose, werden sie zunächst Annexin V positiv. Sie bleiben jedoch in der frühen Apoptose noch 7-AAD negativ und werden daher im rechten Quadranten Q3 dargestellt. In der sich anschließenden späten Apoptose bzw. als tote Zellen werden sie zusätzlich 7-AAD-positiv und werden dann im Quadranten Q2 dargestellt.<sup>193</sup>

Die BRD7-Überexpressionszellen gehen prozentual weniger in die Apoptose als die RCH-ACV-Wildtypzellen, da der Anteil an Zellen, der von dem Quadranten Q4 nach Q2 übergegangen ist (Abbildung 55 (c) und (d)), deutlich geringer war als bei den Wildtypzellen (Abbildung 55 (a) und (b)).

Somit scheinen sich die Zellen aufgrund der konstitutiv aktiven BRD7-Überexpression an das niedrigere pAKT-Level und daher an die Herunterregulation des PI3K-Signalwegs adaptiert zu haben. Möglicherweise haben sie sich durch Mutationen so angepasst, dass dieser Signalweg kaum noch in den Zellen benötigt wird. Dies könnte zur Folge haben, dass höhere Inhibitorkonzentrationen verwendet werden müssen, um überhaupt einen Effekt auf die Viabilität der Zellen zu bewirken.

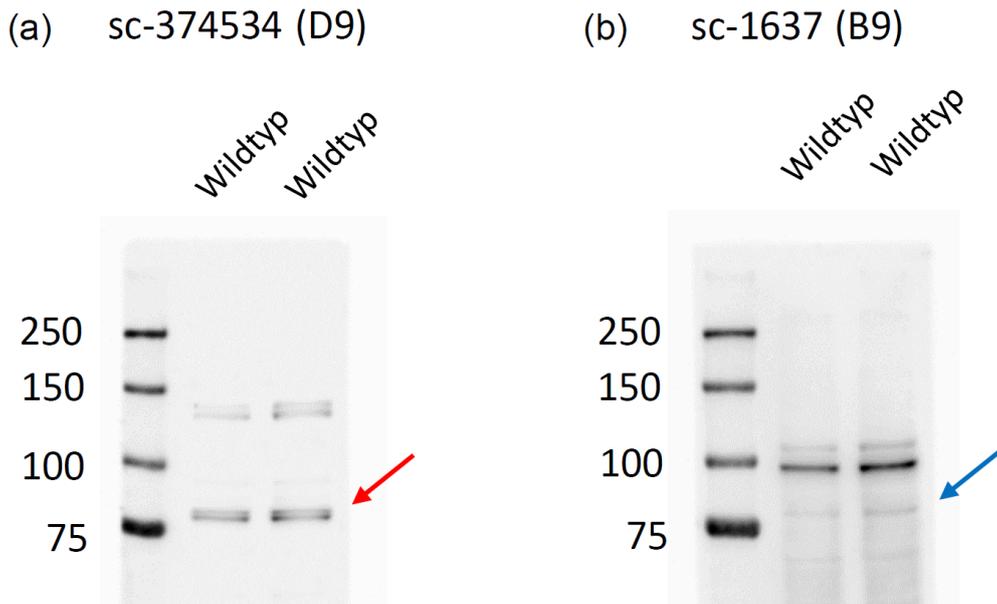


**Abbildung 55: Fluoreszenzdarstellung der viablen und apoptotischen RCH-ACV-Kontroll- und BRD7-Überexpressionszellen nach PI3K-Inhibition** Die Zellen wurden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. Nach 7 Tagen wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. In (a) und (b) sind die Kontrollzellen dargestellt, in (c) und (d) die BRD7-Überexpressionszellen. In (a) und (c) ist die DMSO-Kontrolle dargestellt, in (b) und (d) die Zellen, die mit einer Inhibitorkonzentration von 3.000 nM behandelt wurden. Die Bedienung des Durchflusszytometers sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software BD FACSDIVA™. Die Abbildung zeigt repräsentative Visualisierungen der gemessenen Ergebnisse (n = 3).

#### 4.5.3 Immunopräzipitation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die BRD7-Überexpression einen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT hat, wurde mittels einer Immunopräzipitation untersucht, ob BRD7 und AKT direkt miteinander interagieren. Da AKT einen Teil des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalwegs darstellt, wurde ein Antikörper verwendet, der gegen p85, einen Teil der PI3K, gerichtet ist.

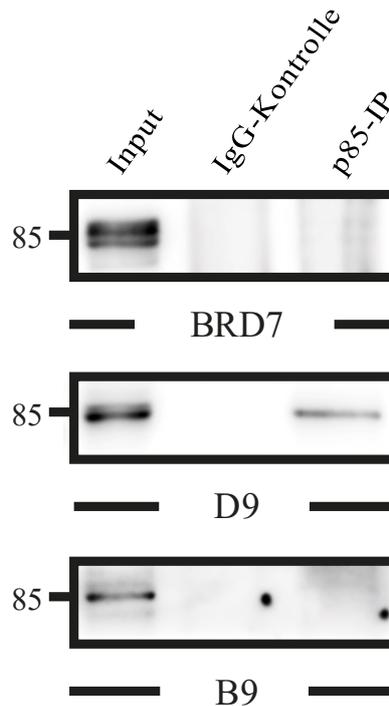
Es wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem zwei p85-Antikörper – D9 und B9 – auf einer Membran mit Kontrollzellen (linke Bande) und BRD7-Überexpressionszellen (rechte Bande) getestet wurden. Anschließend wurde die bei 85 kDa erwartete Bande analysiert.



**Abbildung 56: Immunologische Darstellung zweier Antikörper, die gegen Isoformen von p85 gerichtet sind (in RCH-ACV)** (a) D9 erkennt die p85-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . (b) Der Antikörper B9 detektiert nur die  $\alpha$ -Isoform. Auf der linken Seite ist der verwendete Größenstandard in kDa angegeben. Die Pfeile markieren jeweils die erwartete p85-Bande bei 85 kDa ( $n = 1$ ).

In Abbildung 56a ist der Antikörper dargestellt, der als D9 bezeichnet wird, in b der B9-Antikörper. Die beiden Antikörper detektierten unterschiedliche Isoformen von p85: Der Antikörper D9 erkannte die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , während der Antikörper B9 nur die  $\alpha$ -Isoform detektierte. Dies war auch an der Doppelbande des D9-Antikörpers erkennbar (siehe (a) roter Pfeil). Bei Verwendung des B9-Antikörpers ließ sich auf der Höhe von 85 kDa nur eine sehr schwache Bande detektieren (siehe (b) blauer Pfeil).

Für die Immunopräzipitation wurde ein Zehntel des Lysats nach der Lyse in NP-40-Lysepuffer als Inputkontrolle abgenommen. Dann wurde die Hälfte des restlichen Lysats mit 4  $\mu$ g der Isotyp-Kontrolle versetzt. Die andere Hälfte wurde mit 4  $\mu$ g p85-Antikörper versetzt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden ein BRD7-Antikörper sowie die beiden p85-Antikörper verwendet, die gegen unterschiedliche Untereinheiten gerichtet sind. Bei dem Blot mit dem D9-Antikörper war eine Bande auf der Höhe von p85 erkennbar, während B9 und BRD7 nicht detektiert werden konnten.



**Abbildung 57: Immunologische Darstellung der Immunopräzipitation mit dem p85-Antikörper** RCH-ACV-Zellen wurden in NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden die Interaktionspartner mittels eines p85-Antikörpers präzipitiert. Dann wurde ein Western Blot durchgeführt und BRD7 sowie Isoformen von p85 detektiert. Die linke Bande zeigt die Input-Kontrolle, die mittlere die IgG-Kontrolle und die rechte die Immunopräzipitation mit dem p85-Antikörper. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 2).

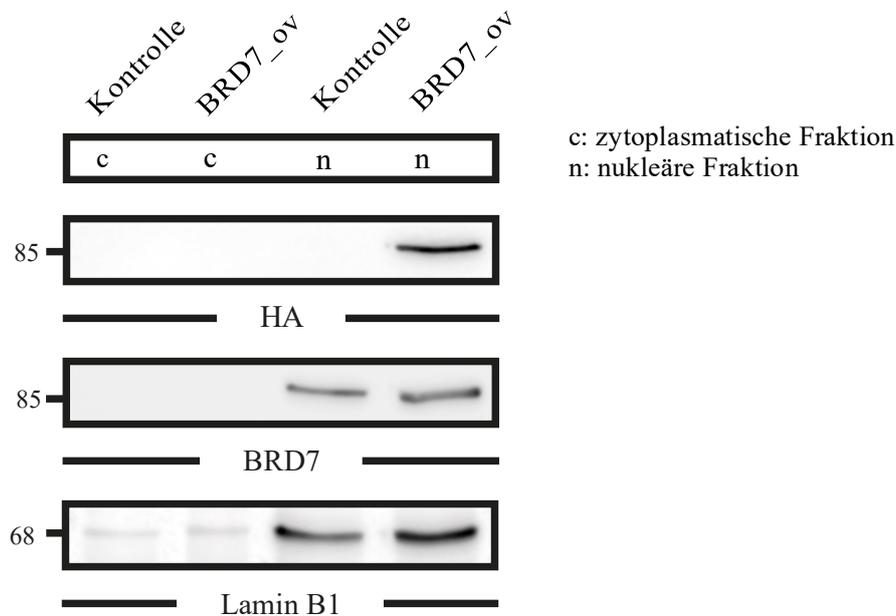
In der Literatur ist eine Interaktion von BRD7 und p85 $\alpha$  in HEK293T-Zellen bereits beschrieben worden.<sup>194</sup> D9, welcher die p85-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  detektiert, konnte in der Immunopräzipitation mit dem p85-Antikörper nachgewiesen werden, während BRD7 und B9 kein Signal lieferten. Da B9 nur die  $\alpha$ -Untereinheit von p85 detektiert, ist davon auszugehen, dass unser verwendeter p85-Antikörper nur Untereinheiten bindet, bei denen es sich nicht um die  $\alpha$ -Isoform handelt. Diese Isoformen scheinen nicht mit BRD7 zu interagieren, da keine BRD7-Bande nachgewiesen werden konnte (Abbildung 57).

Um diese These zu stützen und Fehler auszuschließen, wurde Troubleshooting durchgeführt: Auch das Verwenden höherer Konzentrationen an Antikörper sowie unterschiedlicher Antikörper (Anti-BRD7, Anti-HA, Anti-Flag (siehe 3.1.5.4)) und Lysepuffer (modifizierter Ripa-Lysepuffer, Tris-SDS-Lysepuffer (siehe 3.1.4)) konnte keine BRD7-Interaktion sichtbar machen.

#### 4.5.4 Überexprimiertes BRD7 befindet sich im Nukleus.

Bei der induzierbaren BRD7-Überexpression wurde gezeigt, dass sich das überexprimierte BRD7 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma befindet (siehe Abbildung 48). Nun wurde dieser Versuch mit der konstitutiv aktiven Überexpression wiederholt. Die Fraktionierung wurde mit dem *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* Kit von *Thermo Fisher Scientific* nach Herstellerangaben durchgeführt.

Sowohl der HA-Tag des konstitutiv BRD7-überexprimierenden Vektors als auch BRD7 selbst konnten nur im Nukleus nachgewiesen werden (Abbildung 58). Dies zeigt, dass das überexprimierte BRD7 nur im Nukleus und nicht im Zytoplasma vorkommt.



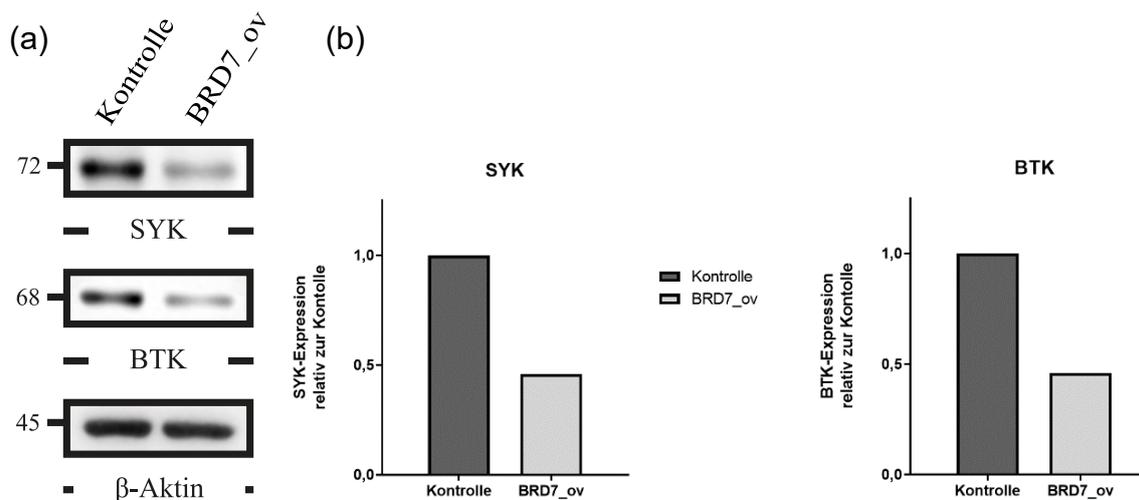
**Abbildung 58: Immunologische Darstellung der Lokalisation von BRD7 bei konstitutiv aktiver BRD7-Überexpression in RCH-ACV** Die BRD7-überexprimierenden Zellen sowie die RCH-ACV-Kontrollzellen wurden fraktioniert. Beim Western Blot wurden zunächst die zytoplasmatischen und anschließend die nukleären Fraktionen aufgetragen. Lamin B1 dient als Beladungskontrolle für die nukleäre Fraktion. Auf der linken Seite ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einem repräsentativen Western Blot (n = 4).

#### 4.5.5 Ansatzpunkt der BRD7-Überexpression

Eine Modulation der BRD7-Expression in Prä-B-Zellen führt zu Veränderungen im PI3K- sowie MEK-Signalweg (siehe 4.5.1.2 und 4.5.1.3). *Upstream* dieser Signalwege gibt es noch weitere Proteine, die bei einer Aktivierung des BZR-

Signalwegs eine Rolle spielen. Daher wurde als Nächstes untersucht, an welcher Stelle des Prä-BZR-Signalwegs eine Modifikation von BRD7 ansetzt.

Es wurden dazu Western Blots mit den Kontrollzellen sowie den BRD7-Überexpressionszellen durchgeführt. Dabei wurden primäre Antikörper, welche gegen die Kinasen SYK und BTK gerichtet sind, verwendet. Diese Kinasen befinden sich *upstream* von AKT und ERK im Rezeptorsignalweg. Die Überexpression von BRD7 führte sowohl zu einem starken Abfall des Signals von SYK als auch von BTK (Abbildung 59a). Dies wurde auch durch die Quantifizierung in Abbildung 59b, bei der die Signale der Überexpressionsproben auf die Banden der Kontrollproben normalisiert wurden, bestätigt: Die Intensität der Signale von SYK und BTK betrug bei den BRD7-Überexpressionszellen jeweils 46 % des Signals der Kontrollzellen. Der Intensitätsabfall ist jedoch aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht statistisch signifikant (SYK:  $p = 0,1320$ ; BTK:  $p = 0,3014$ ).



**Abbildung 59: Immunologische Darstellung von BTK und SYK bei RCH-ACV mit BRD7-Überexpression** Die Zellen überexprimieren konstitutiv BRD7 ( $n = 3$ ). (a) Es wurde ein Western Blot durchgeführt und BTK und SYK detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle, der molekulare Größenstandard ist auf der linken Seite in kDa angegeben. In der Abbildung ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt. (b) Der Signalabfall bei den Überexpressionszellen wurde quantifiziert und visuell dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen die These aufstellen, dass BRD7 nicht nur am PI3K- und MEK-Signalweg ansetzt, sondern auch bereits weiter *upstream*, unter anderem an den Kinasen SYK und BTK.

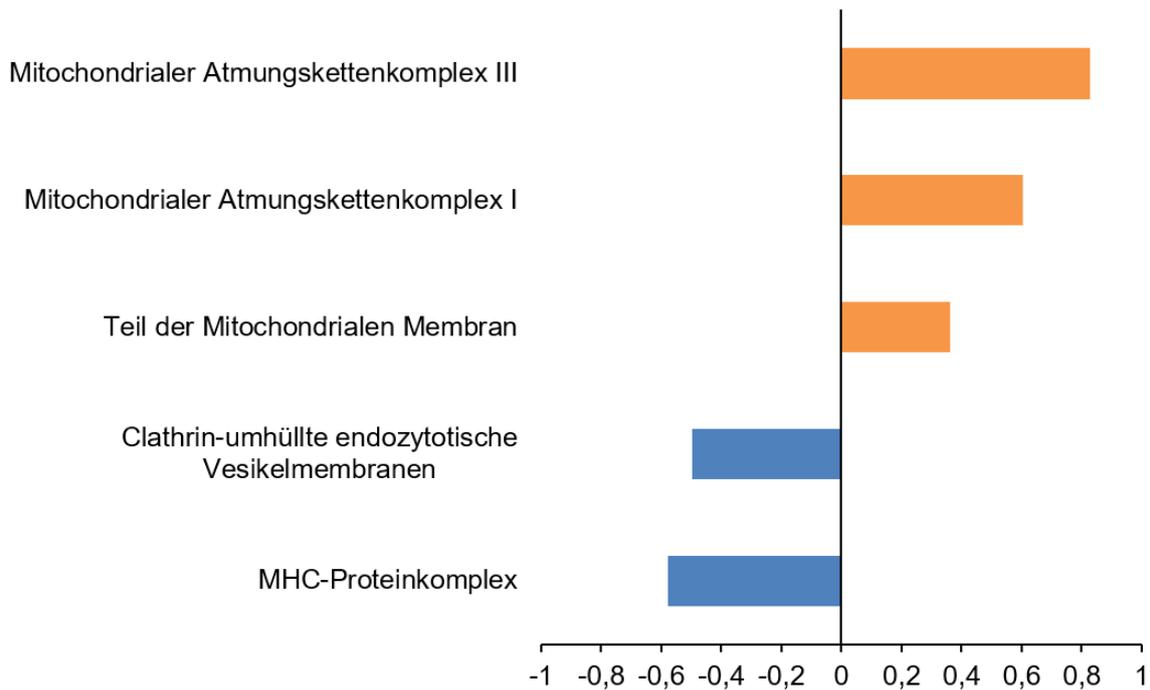
#### 4.5.6 Massenspektrometrische Untersuchung: globales Proteom

Die bei 4.5.5 beschriebenen Western Blots haben gezeigt, dass BRD7 einen Einfluss auf viele unterschiedliche Proteine im Prä-BZR-Signalweg hat. Da eine Untersuchung des globalen Proteoms einen umfassenderen Blick auf die regulierten Proteine liefert, wurde nun eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt.

Für dieses Experiment wurde ein zu dem Überexpressionsplasmid passender Leervektor kloniert, der als Kontrolle verwendet wurde. Um lange Kulturzeiten zu vermeiden und somit etwaige Adaptationsvorgänge der Zellen an die konstitutiv aktive BRD7-Überexpression zu verhindern, wurden die Wildtyp-Zellen zunächst mit SILAC-Medium *Light* und *Heavy* (siehe 3.1.9.1) markiert. Anschließend wurden die *Heavy*-markierten Zellen mit dem BRD7-Überexpressionsvektor transduziert, während die *Light*-markierten Zellen mit dem Leervektor transduziert wurden. 2 Tage später wurde die Selektion der transduzierten Zellen mit Puromycin gestartet. Sobald die Zellen nach der Selektion wieder hochgewachsen waren, konnten sie lysiert und durch Massenspektrometrie analysiert werden. In Abbildung 29 ist der Ablauf des Experiments schematisch dargestellt. Zur Analyse der gewonnenen Daten wurden die ermittelten Strukturen annotiert und Anreicherungsanalysen der Annotationen durchgeführt. Diese wurden mit den Datenbanken *GOCC (Geneontology)*<sup>186</sup>, *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*<sup>187</sup> und *Reactome*<sup>188</sup> abgeglichen.

In Abbildung 60 sind die regulierten Proteinkomplexe in einem Säulendiagramm dargestellt. Zum Abgleich wurde die Datenbank *GOCC* verwendet. Diese ermöglicht es, genetische Sets zu interpretieren und dadurch Spezies auf molekularer oder auf Organismusebene zu analysieren.<sup>186</sup> Auf der rechten Seite sind in *orange* die hochregulierten Komplexe dargestellt, auf der linken in *blau* die herunterregulierten. Je länger die Balken sind, desto stärker wurden die jeweiligen Proteinkomplexe reguliert.

## Anreicherungen (GOCC)

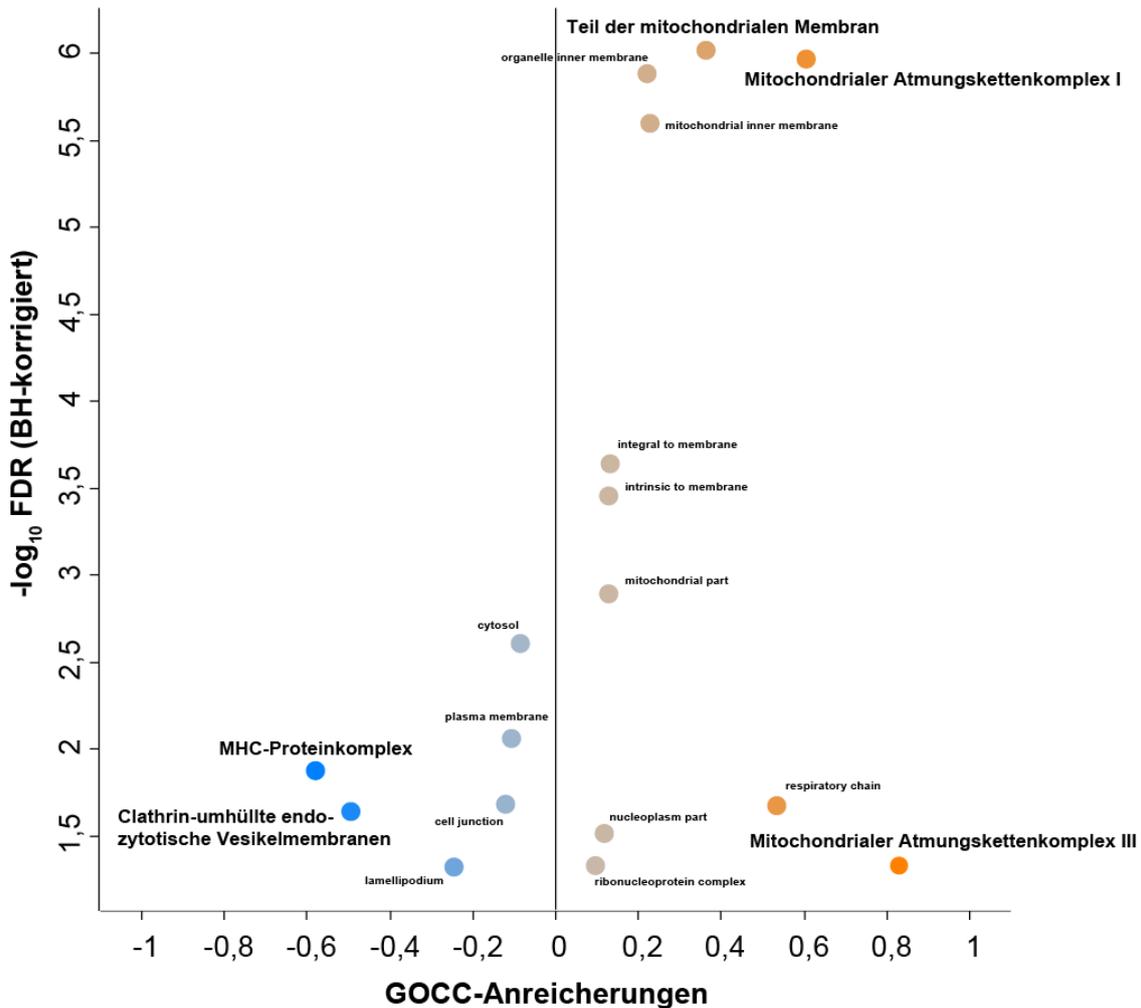


**Abbildung 60: Säulendiagramm der Anreicherungsanalyse des globalen Proteoms der RCH-ACV-Zellen mit BRD7-Überexpression unter Abgleich mit der Datenbank GOCC** Nach Annotation der Proteine wurden Anreicherungsanalysen unter Abgleich mit der Datenbank GOCC durchgeführt. Die Abszisse gibt an, wie stark die auf der Ordinatenachse angegebenen Proteinkomplexe jeweils reguliert wurden (n = 1).

In den BRD7-überexprimierenden Zellen wurde eine mitochondriale Signatur hochreguliert: Die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung – im Besonderen die Komplexe I und III der Atmungskette – sind in BRD7-überexprimierenden Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen, vermehrt vorhanden. Außerdem wurden Proteine der mitochondrialen Membran hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurden Clathrin-umhüllte endozytotische Vesikel und der MHC-Proteinkomplex in den BRD7-Überexpressionszellen herunterreguliert.

In Abbildung 61 sind die positiv und negativ regulierten Proteine der BRD7-Überexpressionszellen dargestellt. Je weiter rechts der vertikalen Null-Linie sie sich befinden, desto stärker wurden sie hochreguliert; je weiter links, desto weniger wurden sie im Vergleich zu den Kontrollzellen exprimiert. Die Ordinatenachse diente der Verifizierung der Ergebnisse: „FDR“ steht für *False discovery rate* und gibt an, wie oft die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wurde und damit „falsch positive Ergebnisse“ auftraten.<sup>195</sup> Sie errechnet sich aus dem Anteil der fälschlicherweise signifikanten Ergebnisse geteilt durch alle signifikanten Ergebnisse und spielt bei der Durchführung von multiplem Testing

eine Rolle. Die bestimmten FDR-Raten können mittels der Benjamini-Hochberg- (BH-) Methode korrigiert werden.<sup>196</sup> Diese dient dazu, die Rate an FDR zu vermindern. Die Messwerte werden dabei zunächst anhand ihrer p-Werte sortiert, anschließend wird jeder p-Wert mit der Anzahl an Tests multipliziert und durch seinen Rang in der Liste geteilt. So erhält man den korrigierten p-Wert. Alle p-Werte, die größer als das gewählte Signifikanzniveau sind, müssen nun verworfen werden.<sup>197</sup>



**Abbildung 61: Darstellung der regulierten Proteine in RCH-ACV mit BRD7-Überexpression unter Abgleich mit der Datenbank GOCC** Auf der linken Seite sind in *blau* die negativ regulierten Proteine dargestellt, auf der rechten Seite in *orange* die hochregulierten Proteine. Die stark regulierten Proteine, auf die ich in der Diskussion näher eingehen möchte, sind größer geschrieben.

Da die Ordinatenachse im negativen Zehnerlogarithmus angegeben ist, führen kleine FDR-Werte zur höher gelegenen Visualisierung in der Abbildung. Daher sollten im Besonderen die Ergebnisse betrachtet werden, die im oberen Bereich der Abbildung liegen, da die Wahrscheinlichkeit, dass diese Strukturen in BRD7-

Überexpressionszellen hochreguliert sind, sehr groß ist. Aus diesem Grund sind der mitochondriale Atmungskettenkomplex I mit einem Score von 0,61 sowie Proteine der mitochondrialen Membran mit einem Score von 0,36 mit großer Wahrscheinlichkeit in BRD7-Überexpressionszellen hochreguliert. Der mitochondriale Atmungskettenkomplex III ist noch stärker hochreguliert (Score von 0,83), jedoch treten hier vermehrt falsch positive Ergebnisse auf.

Neben dem Abgleich der gewonnenen Werte mit der Datenbank GOCC wurden auch die Datenbanken *KEGG* und *Reactome* betrachtet. *KEGG* beschäftigt sich überwiegend mit der Struktur von Biomolekülen und Stoffwechselwegen<sup>187</sup>, während *Reactome* den Fokus auf Molekülinteraktionen auf zellulärer Ebene legt.<sup>188</sup> Insgesamt decken sich diese Ergebnisse mit den Daten, die durch den Abgleich mit der Datenbank GOCC gewonnen wurden:

Der Abgleich der Daten mit der Datenbank *KEGG* zeigt, dass der Elektronentransport in der Atmungskette in BRD7-überexprimierenden Zellen hochreguliert ist.

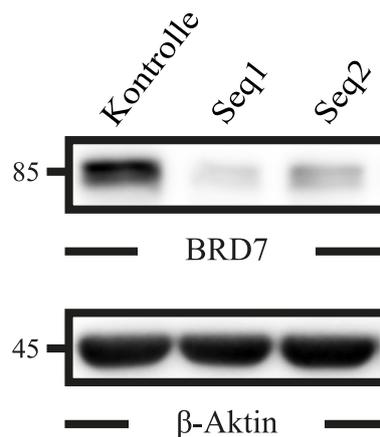
Dass die oxidative Phosphorylierung in Zellen hochreguliert ist, die vermehrt BRD7 exprimieren, ergibt der Abgleich der ermittelten Werte mit der Datenbank *Reactome*. Außerdem sind Mechanismen, die bei der Zellerkennung eine Rolle spielen, in diesen Zellen vermehrt vorhanden. Außerdem zeigte sich eine leichte Herunterregulation der *upstream* im Prä-BZR-Signalweg lokalisierten Kinasen SYK (H/L Ratio -0,4) und BTK (H/L Ratio -0,25). Dies deckt sich mit den bei 4.5.5 mittels Western Blot gewonnenen Ergebnissen bezüglich einer quantitativen Herunterregulation dieser beiden Kinasen.

#### **4.6 BRD7-Knockdown**

Um die Rolle von BRD7 im Prä-BZR-Signalweg genauer zu untersuchen, wurde neben der Überexpression von BRD7 auch ein Knockdown durchgeführt. Dazu wurden zunächst die beiden für den BRD7-Knockdown-kodierenden shRNA-Sequenzen Seq1 und Seq2 in den LT3-GEPIR-Vektor inkloniert und anschließend Viren produziert, mit welchen die RCH-ACV-Zellen transduziert wurden. Dies hat zur Folge, dass das Plasmid in die DNA der Prä-B-Zellen eingebaut wurde.

#### 4.6.1 Klonierung der Vektoren, die für den Knockdown von BRD7 kodieren

Zur Klonierung des BRD7-Knockdowns wurde der LT3-GEPIR-Vektor verwendet. Um sicherzustellen, dass das Einbringen der shRNAs nicht schon zu einer veränderten Genexpression führt, wurden zusätzlich die Kontrollsequenzen shNTC und shGL2 verwendet. Diese exprimieren nach Induktion ebenfalls GFP, jedoch enthalten sie eine unspezifische shRNA-Sequenz und kodieren nicht für den Knockdown von BRD7. In Abbildung 62 sind die Ergebnisse des Western Blots mit den shRNA-exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen dargestellt. Die mit den shBRD7-Sequenzen Seq1 und Seq2 transduzierten Zellen exprimierten deutlich weniger BRD7 als die Kontrollzellen. Im Durchschnitt exprimierte Sequenz 1 0,19-mal so viel BRD7, bei Sequenz 2 waren es etwa 0,42-mal so viel. Sowohl für Sequenz 1 als auch Sequenz 2 ergab sich ein p-Wert  $< 0.0001$  für den Knockdown von BRD7.



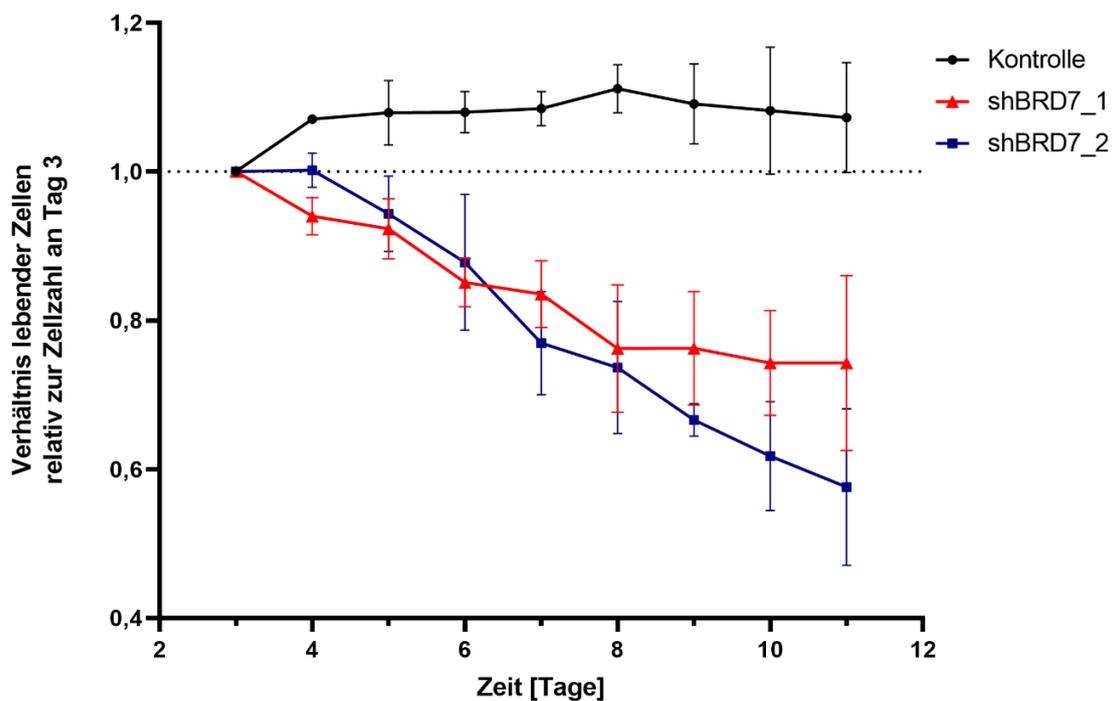
**Abbildung 62: Immunologische Detektion von BRD7 in RCH-ACV mit BRD7-Knockdown**  
Die shBRD7-Sequenzen 1 und 2 wurden gemeinsam mit der Kontrollsequenz aufgetragen. BRD7 und  $\beta$ -Aktin (als Beladungskontrolle) wurden detektiert. Auf der linken Seite ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Als Kontrolle wurde shNTC verwendet. In der Abbildung ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt (n = 4).

#### 4.6.2 BRD7-Knockdown führt zu verminderter Zell-Proliferation

Nachdem bereits ein Effekt auf die Proliferation von BRD7-überexprimierenden Zellen gezeigt werden konnte (siehe 4.4.4), wurde nun untersucht, ob auch der Knockdown von BRD7 einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der RCH-ACV hat. Dazu wurden die Zellen transduziert und 1:1 mit Wildtypzellen gemischt. Nach der Transduktion wurde jeden Tag ein Wettbewerbsassay durchgeführt. Der Anteil an GFP-positiven Zellen wurde auf den Ausgangswert

(Tag 3) normalisiert. Der Verlauf der Kontrollsequenz und der beiden shBRD7-Sequenzen ist ab Tag 3 dargestellt, da ab diesem Zeitpunkt das Verhältnis von Kontrollzellen zu Wildtypzellen in etwa konstant geblieben ist.

In Abbildung 63 ist das Verhältnis der lebenden Zellen relativ zur Zellzahl an Tag 3 gegen den zeitlichen Verlauf (in Tagen) aufgetragen. Es zeigte sich ein Abfall der beiden shBRD7-Sequenzen im Vergleich zur Kontrolle. 8 Tage nach Beginn des Experiments (entspricht Tag 11 in der Abbildung) exprimierte Sequenz 1 noch 74,3 % des Ausgangs-GFP-Werts, bei Sequenz 2 waren es noch 57,6 %. Im Gegensatz dazu blieb die Kontrollsequenz recht stabil und stieg auf 107,2 % des Ausgangswertes an. Die Unterschiede in der Anzahl der lebenden Zellen an Tag 11 waren statistisch signifikant (Kontrolle vs. shBRD7\_1:  $p = 0,0212$ ; Kontrolle vs. shBRD7\_2:  $p = 0.0060$ ).



**Abbildung 63: Wettbewerbsassay mit den shBRD7-Sequenzen 1 und 2 sowie den RCH-ACV-Kontrollzellen** Die Zellen wurden 1:1 mit Wildtypzellen gemischt und anschließend das Ablesen des Vektors induziert. Dann wurden alle 2 Tage ein Wettbewerbsassay durchgeführt und die BRD7-Knockdown-Zellen sowie die Kontrollzellen auf Tag 3 normalisiert. Der Verlauf der viablen Zellen ist ab Tag 3 dargestellt. Die gestrichelte Linie bei 1,0 gibt den Wert an, bei dem die lebenden Zellen (normalisiert auf Tag 3) konstant bleiben würden. Als Kontrolle wurde shGL2 verwendet. Die dargestellten Werte und die Fehlerbalken geben die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung an ( $n = 3$ ).

Dieser Abfall der viablen Knockdown-Zellen widerspricht unseren Erwartungen, da wir auch mit den BRD7-Überexpressionszellen ein vermindertes Proliferationsverhalten feststellen konnten (siehe Abbildung 47) und daher

basierend darauf bei einem Knockdown von BRD7 ein gesteigertes Wachstumsverhalten erwartet hätten. Auf diesen Aspekt werde ich in der Diskussion im Besonderen eingehen.

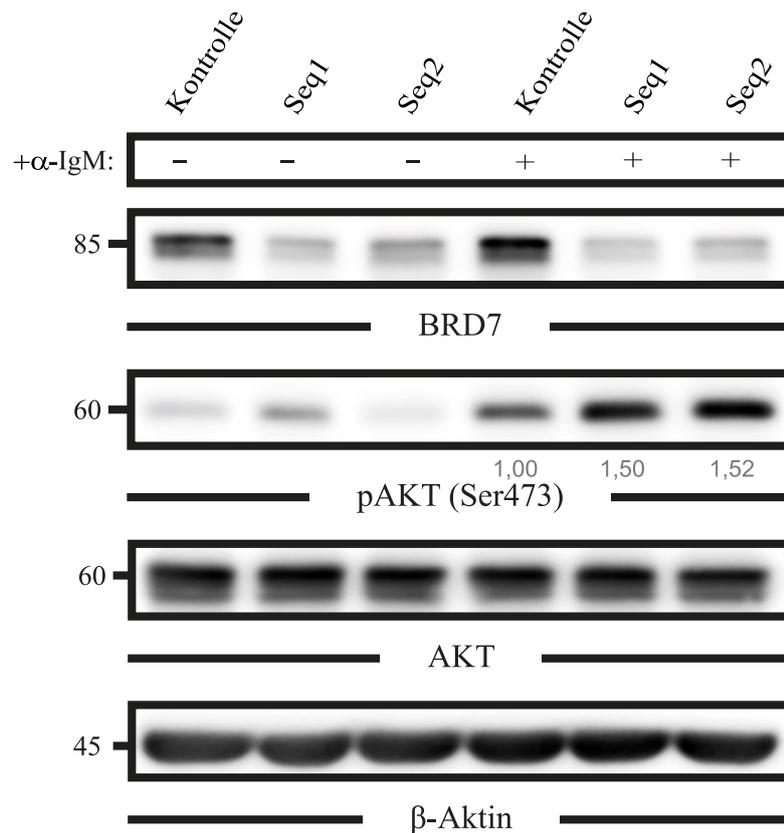
### **4.6.3 Untersuchungen mit Stimulation der Knockdownzellen**

#### **4.6.3.1 BRD7-Knockdown führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT.**

Nachdem bereits Effekte auf die Signalwege in BRD7-überexprimierenden Zellen gezeigt werden konnten, wurde nun der Einfluss eines Knockdowns von BRD7 auf die Phosphorylierung von AKT untersucht. Dazu wurden die shBRD7-exprimierenden Zellen sowie die Kontrollzellen in serumfreiem Medium ausgesät und der Prä-BZR der Hälfte der Zellen nach 30 min Inkubation für 5 min mit  $\alpha$ -IgM stimuliert. Nachdem die Zellen lysiert worden waren, wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem zur Kontrolle der Stimulation auch die unstimulierten Zellen mit aufgetragen wurden.

In Abbildung 64 sind die Ergebnisse des Western Blots dargestellt. Sowohl bei den stimulierten als auch den unstimulierten Zellen kam es im Vergleich zur Kontrollsequenz zu einem deutlichen Knockdown von BRD7. Dieser führte bei den mit den shBRD7-Sequenzen 1 und 2 transduzierten Zellen zu einer Steigerung des pAKT-Signals. Der Blot auf AKT diente hierbei der Normalisierung und verdeutlichte, dass nur die Phosphorylierung von AKT reguliert ist und nicht auch die Menge an AKT selbst.

Zur Quantifizierung des pAKT-Signals wurde die Software *ImageJ* verwendet. Die Signalstärke des pAKTs wurde gemessen und anschließend durch die Signalstärke des jeweiligen AKT-Signals geteilt. Dann wurden die so ermittelten Werte für Sequenz 1 und Sequenz 2 auf den Wert der Kontrolle normalisiert. Ohne eine Stimulation des Prä-BZRs war das pAKT-Signal zu schwach, um eine Aussage über den Verlauf zu machen, daher wurde die Quantifizierung nur bei den stimulierten Zellen durchgeführt. Das pAKT-Signal der shBRD7-Sequenz 1 war 1,5-mal so hoch wie das der Kontrollsequenz. Bei Sequenz 2 zeigte sich ein Anstieg auf 1,52. Der Phosphorylierungsanstieg von AKT ist jedoch nicht statistisch signifikant (Seq2:  $p = 0,0752$ ; Seq3:  $p = 0,1717$ ).



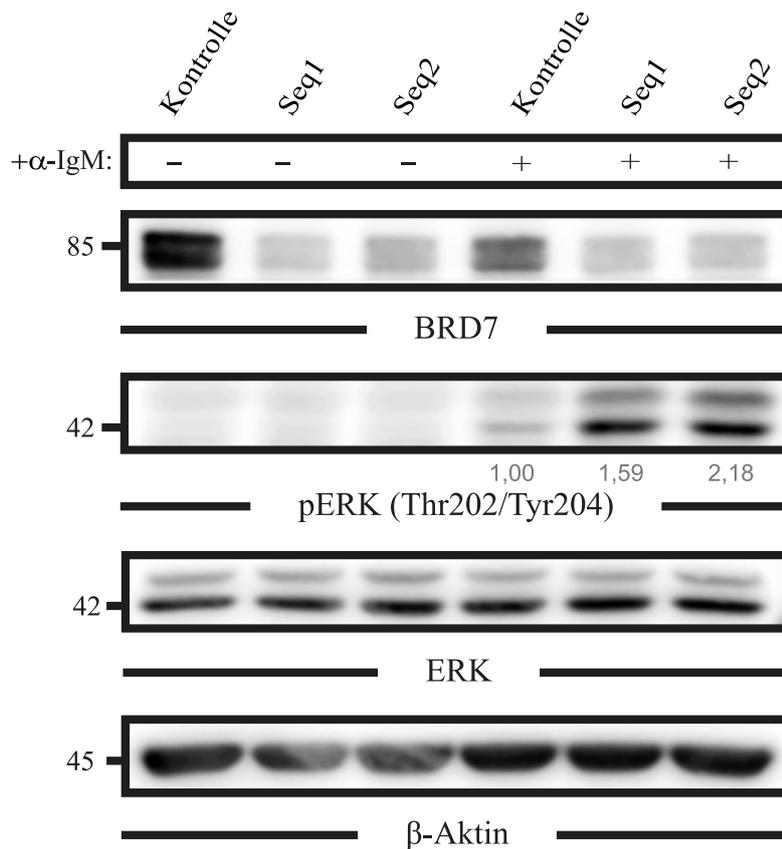
**Abbildung 64: Immunologische Darstellung von pAKT (Ser473) in RCH-ACV nach BRD7-Knockdown** Die mit den shBRD7-Sequenzen 1 und 2 transduzierten Zellen sowie die Kontrollzellen wurden induziert und zur Hälfte stimuliert. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Auf der linken Seite sind die unstimulierten, rechts die mit  $\alpha$ -IgM stimulierten Zellen aufgetragen. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben das bei den shBRD7-Sequenzen mittels einer Quantifizierung ermittelte Ausmaß der Phosphorylierungssteigerung im Vergleich zur Kontrollsequenz an. Als Kontrolle wurde shNTC verwendet,  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot (n = 5).

#### 4.6.3.2 BRD7-Knockdown führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK.

Nachdem der Einfluss des Knockdowns von BRD7 auf die Phosphorylierung von AKT bestätigt worden war, wurde nun untersucht, ob auch die Phosphorylierung von ERK beeinflusst wird. Dazu wurde wiederum der Prä-BZR der mit den shBRD7-Sequenzen transduzierten Zellen sowie der Rezeptor der Kontrollzellen nach 30 min Inkubation in serumfreiem Medium für 1 min mit  $\alpha$ -IgM stimuliert. Nachdem die Zellen lysiert worden waren, wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem zum Vergleich auch die unstimulierten Zellen aufgetragen wurden.

Die Auftragung in Abbildung 65 erfolgte analog zu Abbildung 64. Der Knockdown von BRD7 führte bei den Sequenzen 1 und 2 – im Vergleich zur Kontrollsequenz

– zu einer Steigerung des pERK-Signals. Analog zum Blot auf AKT wurde eine Quantifizierung durchgeführt. Der Knockdown von BRD7 mittels der Sequenz 1 hatte einen pERK-Anstieg auf 1,59 zur Folge, die Verwendung von Sequenz 2 bewirkte einen Anstieg auf 2,18 im Vergleich zur Kontrolle. Der Phosphorylierungsanstieg von ERK ist statistisch deutlich signifikant (Seq2:  $p = 0,0241$ ; Seq3:  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 65: Immunologische Darstellung von pERK in RCH-ACV nach BRD7-Knockdown** Die mit den shBRD7-Sequenzen 1 und 2 transduzierten Zellen sowie die Kontrollzellen wurden induziert und zur Hälfte stimuliert. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Die in grau dargestellten Zahlenwerte geben bei den shBRD7-Sequenzen das mittels einer Quantifizierung ermittelte Ausmaß der Phosphorylierungssteigerung im Vergleich zur Kontrollsequenz an. Als Kontrolle wurde shNTC verwendet,  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle. Auf der linken Seite der Banden ist der molekulare Größenstandard in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot ( $n = 7$ ).

#### 4.7 Fazit des Ergebnisteils

Zusammenfassend ist zu sagen, dass DOT1L keine Effekte auf Nicht-MLL-rearrangierte Zellen gezeigt hat. Die Überexpression von BRD7 führte beim Western Blot zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und ERK und zu einem Wachstumsnachteil im Wettbewerbsassay. Massenspektrometrische

Analysen ergaben außerdem eine Hochregulation der mitochondrialen Komplexe der Atmungskette bei BRD7-Überexpression. Der Knockdown von BRD7 hatte eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT und ERK und ebenfalls eine verminderte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen zur Folge. Die Prä-B-Zellen RCH-ACV zeigten einen Wachstumsnachteil nach Behandlung mit PI3K-Inhibitoren, jedoch nicht nach MEK-Inhibition.

## 5 Diskussion

B-Lymphozyten und ihre Vorläuferzellen stellen den Ursprung vieler maligner Erkrankungen wie der ALL dar. Bei der Prä-B-Zell-ALL werden die Zellen in ihrer Ausreifung zur naiven B-Zelle gestört und beginnen unkontrolliert zu proliferieren, wodurch die normale Zellbildung im Knochenmark verdrängt wird.<sup>1</sup> Bei der normalen Hämatopoese stellt der Prä-BZR einen wichtigen Kontrollpunkt bei der Entstehung unreifer B-Zellen aus Prä-B-Zellen dar.<sup>19</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass es in der Vergangenheit bereits viele Bestrebungen gab, den Rezeptor sowie die von ihm ausgehenden Signalwege genauer zu charakterisieren.

Wie in 1.4 beschrieben, fielen in unserer Arbeitsgruppe bei der Untersuchung der BZR-Signalwege in den Prä-B-Zellen RCH-ACV die *downstream* des Rezeptors vorkommenden Effektormoleküle BRD7 und DOT1L als geeignete Kandidaten auf. Durch SYK-Inhibition wurde der Phosphorylierungszustand bestimmter Aminosäuren der Proteine verändert: Bei BRD7 kam es zu einer gesteigerten Phosphorylierung eines Serinrests an Position 237, bei DOT1L eines Serinrests an Position 1349. Während die Bedeutung der Proteine in anderen Tumorentitäten bereits beschrieben worden ist<sup>114,131</sup>, sind sie in RCH-ACV noch nicht umfassend studiert worden. Wir stellten somit die Hypothese auf, dass die Modifikation der Expression von BRD7 und DOT1L einen Einfluss auf Proliferation und Apoptose von Prä-B-Zellen hat und sie somit als Ansatzpunkte bei der Therapie von Prä-B-Zell-ALL dienen können.

Ziel meiner Doktorarbeit ist es, die Bedeutung der Effektormoleküle DOT1L und BRD7 bei der Prä-B-Zell-ALL zu analysieren. Dadurch wird ein tieferer Einblick in die molekularen Mechanismen der Signalwege, welche vom Prä-BZR ausgehen, ermöglicht. Zudem sollten auch die B-Vorläuferzellen RCH-ACV genauer charakterisiert und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Signalwegen wie dem MAPK- und dem PI3K-Signalweg studiert werden. Dies dient dazu, die Effekte zu analysieren, die durch eine Modifikation von BRD7 und DOT1L in den Zellen ausgelöst werden. Insgesamt sollen durch diese Untersuchungen neue therapeutische Ansatzpunkte bei der Prä-B-Zell-ALL aufgedeckt werden.

## 5.1 Prä-BZR als therapeutischer Ansatzpunkt bei ALL

Bei der ALL kommt es zur klonalen Vermehrung von B-Zellen. Diese verdrängen die normale Hämatopoese im Knochenmark, sind aber selbst nicht ausgereift genug, um die humorale Immunantwort als Teil des adaptiven Immunsystems auszuführen. Daher liegt ein Ansatzpunkt aktueller ALL-Therapien in einer Verminderung der Proliferation der entarteten B-Zellen. Die in dieser Dissertationsarbeit untersuchten Zellen sind in der Entwicklungsstufe der Prä-B-Zellen entartet. Es bietet sich daher an, den Prä-BZR als therapeutischen Ansatzpunkt bei Leukämien in Betracht zu ziehen, da er in der Hämatopoese einen wichtigen Kontrollpunkt beim Übergang von der Pro- zur Prä-B-Zelle darstellt: Nur Prä-B-Zellen mit einem funktionellen Rezeptor können weiter ausreifen.<sup>19,21</sup> Es stellt sich nun die Frage, ob bei der hier untersuchten Form der ALL eine reguläre Signalwirkung über den Prä-BZR stattfindet.

Müschen beschrieb 2015, dass 85 % aller reifzelligen B-Zelllymphome von einem aktiven BZR-Signal abhängig sind<sup>198</sup>; bei Prä-B-Zell-ALL seien es jedoch nur 13,5 %. Diese ALL-Zellen zeigen eine tonische Aktivierung des Prä-BZRs und reagieren sensitiv auf eine Inhibition von SYK, BTK und PI3K $\delta$ . Sie werden als Prä-BZR-positive ALL-Zellen bezeichnet und exprimieren den Transkriptionsfaktor BCL6, welcher insbesondere bei B-Zelllymphomen vermehrt gebildet wird. Außerdem aktivieren sie in 50 % der Fälle den Transkriptionsfaktor PBX1.<sup>199</sup> Dieser ist für die B-Zellentwicklung wichtig und aktiviert außerdem wiederum Effektoren des Prä-BZR-Signalwegs wie CD79a, BTK oder Teile der leichten Kette des Rezeptors. Eine weitere genetische Läsion, die sich wiederkehrend in Prä-BZR-positiven Zellen finden lässt, ist die Deletion von 6q21, welche in etwa 1 % aller ALL-Fälle auftritt. Diese Deletion führt zum Verlust des Transkriptionsfaktors PRDM1 (*PR domain zinc finger protein 1*), welcher eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen spielt.<sup>200,201</sup> Von den onkogenen Signalen des Prä-BZRs ist vor allem die Unterform der Ph-like-ALL abhängig; diese Zellen zeigen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*)<sup>86,198</sup>, der bei der Pathogenese vieler hämatologischen Erkrankungen bedeutsam ist.<sup>202</sup>

In einer Analyse von 830 Patienten mit Prä-B-Zell-ALL konnten Geng *et al.* zeigen, dass nur in 13,5 % der Fälle funktionelle BZR vorhanden sind.<sup>199</sup> Ursächlich hierfür seien Deletionen im VPREB1- Gene<sup>62,203</sup> und Fehler bei der V(D)J-Rekombination der schweren Kette.<sup>204</sup> Eine Rekonstruktion des Prä-BZR würde jedoch bei diesen Zellen zur Einleitung der Apoptose führen. Dies verdeutlicht, dass der Prä-BZR selbst als Tumorsuppressor wirken kann: In Philadelphia-positiven Zellen kommt es durch die Expression des Rezeptors zum Arrest des Zellzyklus.<sup>205</sup> Außerdem treten bei ALL häufig fehlerhafte Formen der BZR-proximalen Tyrosinkinasen BTK und BLNK auf. Als Tumorsuppressoren im Prä-BZR-Signalweg verhindern diese Kinasen die maligne Entartung von B-Zellen.<sup>206,207</sup>

Somit ist ein Teil der Prä-B-ALL-Untergruppen einerseits abhängig vom Prä-BZR, andererseits führt eine Rekonstruktion des Rezeptors bei Zellen ohne funktionellen BZR zum Zelltod.<sup>199,208</sup> Dennoch sind die Signale des Rezeptors bedeutsam für die Zellproliferation maligner Zellen, da in entarteten Zellen oftmals eine Imitation der Proliferationssignale eines konstitutiv aktiven BZR stattfindet: Bei Philadelphia-positiver ALL werden Tyrosinkinasen wie BLK<sup>209</sup> und BTK<sup>210</sup> hochreguliert, bei Philadelphia-like ALL die ABL1-Fusionskinase.<sup>86</sup> Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz des Prä-BZR in naiven sowie in entarteten B-Zellen. Hierbei ist ein feines Gleichgewicht essenziell, da sowohl eine zu niedrige als auch eine zu hohe Signalwirkung des Prä-BZR zu toxischen Effekten auf die Zellen führen: Eine übermäßige Signalwirkung während der Entwicklung der B-Zellen stellt ein Zeichen für eine Autoimmunität der Zellen dar. Diese Zellen werden daraufhin negativ selektioniert und in die Apoptose getrieben.<sup>208</sup> Diese Erkenntnisse brachten Müschen zu dem Schluss, dass in Leukämiezellen, die resistent gegen die üblicherweise angewandten Chemotherapeutika sind, Kontrollpunkte als therapeutische Ansatzpunkte gewählt werden können, die der Detektion von autoimmunen Zellen dienen. Durch Förderung von Signalen, die eine Autoimmunität der Zellen aufzeigen, wird die Apoptose eingeleitet. Ein Beispiel, wie eine Überaktivität des Prä-BZR suggeriert werden kann, ist die Hyperaktivierung der *upstream* im Signalweg ansetzenden Kinase SYK (siehe 5.5.2.3). Daher sollte in Zukunft an weiteren

Effektoren geforscht werden, die durch ihre gezielte Regulation bei Resistenzen gegen regulär verwendete Chemotherapeutika eingesetzt werden könnten.<sup>211</sup>

Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass der Prä-BZR einen guten therapeutischen Ansatzpunkt bei ALL dargestellt. Insgesamt ist es wichtig, die molekularen Mechanismen, die vom Prä-BZR ausgehen, gezielt zu erforschen. So können neue therapeutische Ansatzpunkte für das Krankheitsbild der ALL geschaffen werden. Insbesondere sollte evaluiert werden, von welchen Signalwegen die jeweiligen ALL-Unterformen abhängig sind, da so eine gezielte Inhibition stattfinden kann. Ph-like-Zellen reagieren beispielsweise sensitiv auf spezifisch gegen ihre Veränderungen gerichtete Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), weshalb diese einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.<sup>86</sup> Imatinib, der erste TKI, der entwickelt wurde, blockiert die ATP-Bindungsstelle der ABL-Kinase.<sup>212</sup> Weitere vielversprechende TKIs – mit im Vergleich zu Imatinib höherer Affinität zur ABL-Kinase bzw. höherer Potenz – sind Nilotinib und Dasatinib.<sup>213</sup> Es kommt jedoch schnell zur Resistenzentwicklung, da der Transkriptionsfaktor BCL6 durch die Anwendung von TKIs induziert wird, weswegen der gleichzeitige Einsatz eines BCL6-Inhibitors notwendig ist.<sup>214</sup> Bei Mutationen, die zu einer Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs führen, können hingegen JAK-Inhibitoren wie beispielsweise Ruxolitinib eingesetzt werden.<sup>215</sup> Auf Inhibitoren gegen die Kinase SYK, die aktuell *in vitro* bzw. *in vivo* eingesetzt werden, werde ich unter 5.11 genauer eingehen.

Es stellt sich jedoch die Frage, ob sich eine therapeutische Hemmung des Prä-BZRs nachteilig auf die Ausreifung der B-Zellen auswirken kann. Um diese Frage zu beantworten, kann man sich die Folgen einer Splenektomie vor Augen führen: Die Milz stellt als größtes lymphatisches Organ des Körpers eine Filterstation des Blutes dar. Sie ist für die weitere Ausreifung der naiven B-Zellen nach Antigenkontakt<sup>15</sup> und für die Antikörperbildung bedeutsam. Obwohl somit nach einer Splenektomie die Ausreifung der B-Zellen eingeschränkt ist, können Menschen, die aufgrund von therapeutischen Gründen eine Splenektomie erhalten haben, trotzdem ohne übermäßige Beeinträchtigung weiterleben.<sup>216</sup> Aus diesem Grund ist die Hemmung des Prä-BZRs ein in Bezug auf die Immunantwort ungefährlicher Ansatzpunkt bei der Therapie der Prä-B-Zell-ALL.

## **5.2 Nicht-MLL-rekombinierte Zellen zeigen keine Abhängigkeit von DOT1L.**

In dieser Dissertationsarbeit konnte keine Abhängigkeit der RCH-ACV von DOT1L gezeigt werden. Dies unterstützt die These vieler Arbeiten, dass DOT1L vorwiegend in MLL-rekombinierten Zellen bedeutsam ist, da diese auf die H3K79-Methylierung durch DOT1L angewiesen sind.<sup>190</sup> Okada *et al.* beschrieben die Interaktion von DOT1L und dem MLL-Fusionspartner AF10, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von MLL-rekombinierten Leukämien spielt. Dabei kommt es zur Expression von Leukämie-relevanten Genen wie HoxA9.<sup>114</sup> Wie bereits in Abbildung 15 gezeigt, ist das Ausmaß der Viabilitätshemmung der DOT1L-Inhibitoren abhängig von der Art ihrer MLL-Rekombination: Die stärkste Abhängigkeit zeigten MV4-11, die eine MLL-AF4-Rekombination tragen und in dieser Dissertationsarbeit als Kontrollzellen verwendet wurden. Im Allgemeinen ist jedoch für Zellen mit MLL-AF9-Rekombination eine stärkere DOT1L-Abhängigkeit als für Zellen mit MLL-AF4-Rekombination beschrieben worden.<sup>115</sup> Bisher konnten noch keine nicht-MLL-rekombinierten Zelllinien gefunden werden, die von DOT1L abhängig sind. Diesem Aspekt sollte in Zukunft nachgegangen werden, da die Methylierung von Histonen als kovalente posttranslationale Modifikation bedeutsame Effekte auf die Genexpression hat.<sup>217</sup> Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob es Zelllinien gibt, bei denen es auch ohne die Interaktion mit MLL-Fusionsproteinen zur vermehrten Expression Leukämie-relevanter Gene kommt. In diesem Fall könnten potente DOT1L-Inhibitoren wie Pinometostat (EPZ-5676), welcher auch in dieser Dissertationsarbeit verwendet wurde, therapeutisch eingesetzt werden. Hierbei ist besonders seine hohe Selektivität und Wirkstärke zu nennen: In präklinischen Untersuchungen ist für Pinometostat eine 37.000-fach stärkere Selektivität im Vergleich zu allen anderen getesteten Histonmethyltransferasen beschrieben worden. Eine Inhibition findet bereits bei 80 pM statt.<sup>115</sup> In klinischen Studien zeigte sich jedoch für eine Monotherapie mit Pinometostat bei Patienten mit MLL-Rekombination nur ein unzureichendes Ansprechen,<sup>218</sup> wohingegen bei Kombination mit ALL-Standardmedikamenten wie MTX und Vincristin additive Effekte auftraten.<sup>219</sup>

### 5.3 BRD7 zeigt einen Tumorsuppressor-Phänotyp in RCH-ACV.

Um die vom Prä-BZR ausgehenden Signalwege genauer zu studieren, haben wir uns überwiegend mit dem Regulatorprotein BRD7 beschäftigt, welches *downstream* im Prä-BZR-Signalweg lokalisiert ist. In einigen soliden Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, Nasopharynxkarzinom und Kolorektalem Karzinom ist der Tumorsuppressor-Phänotyp von BRD7 bereits beschrieben worden.<sup>128-130</sup> Da BRD7 in B-Zellen noch nicht so umfassend studiert worden ist, wurde in dieser Dissertationsarbeit nun vermehrt der Fokus auf diesen Aspekt gelegt. BRD7 stellt einen globalen epigenetischen Regulator dar, es ist jedoch noch unklar, auf welche Weise er in die Proteinregulation und in das Proliferationsverhalten der Prä-B-Zellen eingreift. In dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Expression von BRD7 zu Effekten im PI3K- sowie MEK-Signalweg führen. Eine BRD7-Überexpression führt dabei zu einer verminderten Phosphorylierung der Kinasen AKT und ERK (siehe 4.5.1.2 und 4.5.1.3). In der Literatur ist beschrieben, dass AKT an zwei Stellen phosphoryliert werden muss um aktiviert zu werden: zum einen an Position T308 in der Aktivierungsschleife durch die Proteinkinase PDK1, zum anderen an Position S473 durch den mTOR complex 2.<sup>27</sup> Crews *et al.* konnten zeigen, dass ERK zur Aktivierung durch MEK zunächst an einem Tyrosin- und anschließend an einem Threoninrest phosphoryliert wird.<sup>220</sup> Umgekehrt bedeutet eine Dephosphorylierung dieser beiden Kinasen, dass ihre eigene Phosphorylierungsaktivität gemindert wird und somit die Weiterleitung von Signalen auf weiter *downstream* lokalisierte Kinasen im PI3K- und MEK-Signalweg nur eingeschränkt stattfindet. Aus diesem Grund hat eine Überexpression von BRD7 eine verminderte Aktivierung der Kinasen PI3K und MEK zur Folge.

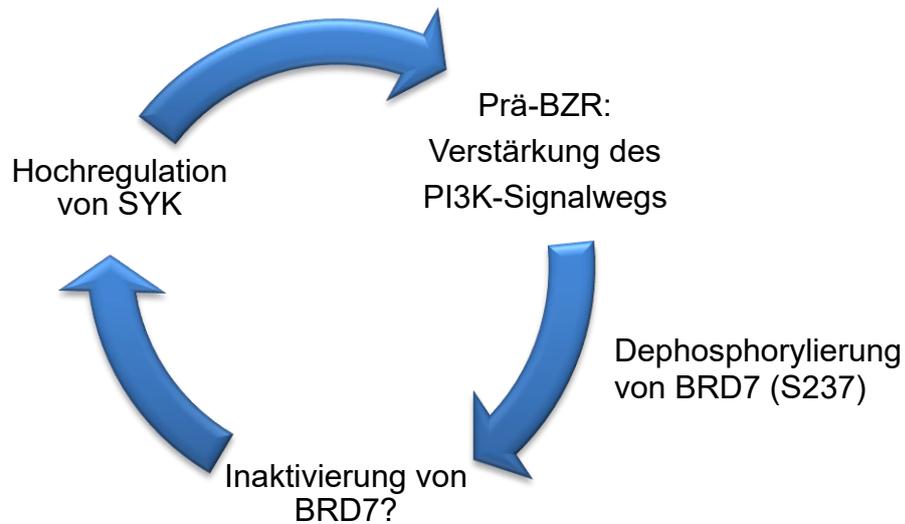
Die erläuterten Experimente zeigten weiterhin, dass BRD7-überexprimierende Zellen einen Proliferationsnachteil gegenüber Kontrollzellen aufweisen. Die Zellen zeigen eine verminderte Viabilität und ein verlangsamtes Wachstum (siehe 4.4.4). Somit agiert BRD7 auch in Prä-B-ALL-Zellen als Tumorsuppressor.

Da die beschriebenen Effekte nur in Kompetitionsassays gezeigt werden konnten und Apoptose-Assays keine messbaren Veränderungen lieferten, scheint eine Modifikation des Expressionsniveaus von BRD7 nur Effekte auf die Proliferation

der Zellen zu haben: Die Zellen wachsen langsamer; nicht-proliferierende Zellen werden jedoch nicht in die Apoptose getrieben. Da die maligne Entartung der B-Zellen bei ALL mit unkontrollierter Proliferation der Zellen einhergeht<sup>221</sup>, sind die Veränderungen im Proliferationsverhalten dennoch als therapeutischer Ansatzpunkt bei ALL denkbar. Darüber hinaus führt eine Erhöhung der Konzentration von BRD7 gleichzeitig immer auch zu Effekten auf proapoptische Signalwege, da vielfältige Interaktionen zwischen BRD7 und den Signalwegen des Prä-BZRs bestehen (siehe 5.4). Auf die theoretischen und die klinisch umsetzbaren Optionen, eine Modifikation von BRD7 therapeutisch einzusetzen, werde ich in 5.11 genauer eingehen.

#### **5.4 Hypothetische Prä-BZR/BRD7-Feedback-Schleife**

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine SYK-Inhibition die Signalweiterleitung in Prä-B-Zellen modifiziert, da die Phosphorylierung der Kinase AKT vermindert ist (siehe Abbildung 12). Außerdem verdeutlichen die gewonnenen Ergebnisse, dass eine Inhibition von SYK in RCH-ACV zu einer Steigerung der Phosphorylierung von BRD7 an einem Serinrest an der Position 237 führen kann. Die Überexpression von BRD7 führte zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und damit zur Inaktivierung des PI3K-Signalwegs. Umgekehrt steigerte die Herunterregulation von BRD7 das Ausmaß an phosphoryliertem AKT. Dies legt den Schluss nahe, dass eine Inaktivierung von BRD7 die Aktivität der Kinase SYK steigert, welche sich *upstream* im PI3K-Signalwegs befindet. Diese Hochregulation von SYK verstärkt nun wiederum den Prä-BZR- und den PI3K-Signalweg. Somit stellen wir die Hypothese auf, dass eine Feedback-Schleife zwischen Prä-BZR-Aktivierung, BRD7 und PI3K-Signalweg existiert (Abbildung 66). Die gewonnenen Ergebnisse sind mit dieser Feedback-Schleife erklärbar, jedoch müssen die einzelnen Schritte noch experimentell validiert werden.



**Abbildung 66: Schematische Darstellung der hypothetischen Feedback-Schleife bei Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs** Eine Aktivierung des Prä-BZRs führt zu einer Verstärkung des PI3K-Signalwegs, was eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von BRD7 zur Folge hat. Dies führt zu einer Hochregulation von SYK und damit zur gesteigerten Aktivierung von AKT, was wiederum eine vermehrte Aktivierung des PI3K-Signalwegs bedeutet. Diese These muss noch experimentell validiert werden.

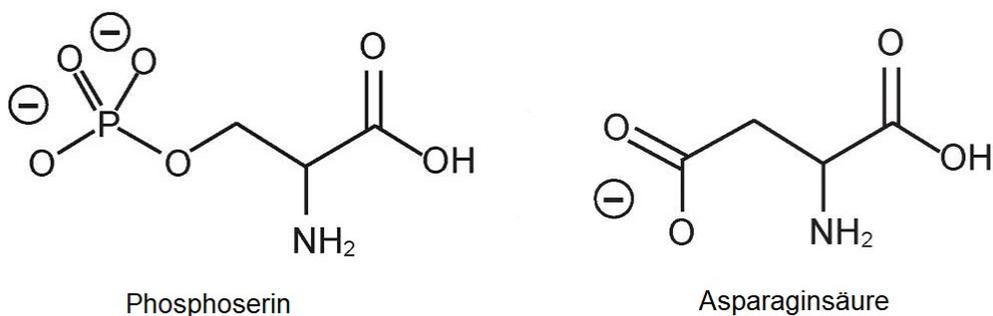
Veränderungen im Phosphorylierungszustand von Proteinen sind somit ein essenzieller Bestandteil dieser Feedback-Schleife. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen stellen einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Aktivität von Proteinen dar.<sup>222</sup> Die Bedeutsamkeit dieses Mechanismus konnte bereits 1955 von Fischer und Krebs gezeigt werden.<sup>192</sup> Somit stellt die Analyse der regulierten Phosphorylierungsstelle (*phosphosite*) in BRD7 (Serin an Position 237) einen zentralen Aspekt beim Verständnis von BRD7 dar. Es stellt sich die Frage, ob die Dephosphorylierung von S237 durch eine Aktivierung des Prä-BZR-Signalwegs zu einer Inaktivierung von BRD7 führt. Es ist anzunehmen, dass es sich um eine aktivierende Phosphorylierungsstelle handelt, da BRD7 – wie bei 5.3 erläutert – einen Tumorsuppressor-Phänotyp aufweist: Da sich Zellen und insbesondere Tumorzellen nach ihrer Aktivierung nicht selbst in die Apoptose treiben würden, ist es wahrscheinlicher, dass an dieser Stelle ein Tumorsuppressor inaktiviert werden würde.

#### 5.4.1 Untersuchung der BRD7-Phosphosite mittels Phosphomimetikum

Um die Phosphosite genauer zu studieren, könnte ein möglicher Ansatzpunkt ein Phosphomimetikum (*phosphomimetics*) sein. Durch Mutation einer Base im

Genom entsteht bei der Proteinbiosynthese eine andere Aminosäure, welche die phosphorylierte Form der ursprünglichen Aminosäure imitiert. Aminosäuren, die diesen Effekt bewirken, tragen einen negativen Rest wie beispielsweise Asparaginsäure oder Glutaminsäure.<sup>223</sup> Dieser Effekt kann zur Klonierung in der Forschung angewandt werden.<sup>224</sup>

Zur Analyse der BRD7-Phosphosite wäre die Klonierung einer Knock-in-Mutante sinnvoll. Im Gegensatz zu dem in dieser Dissertationsarbeit angewendeten Knockout-Verfahren wird hierbei ein spezifisches Gen hochreguliert.<sup>225</sup> Es könnte ein Knock-in durchgeführt werden, bei dem an Position 237 des BRD7 anstatt des Serins ein Aspartatrest inkloniert wird. Somit wird konstitutiv die phosphorylierte – und damit aktive – Form des Serins imitiert. Handelt es sich um eine aktivierende Phosphorylierungsstelle, hätte dies eine Steigerung der Aktivität von BRD7 zur Folge, da die Aminosäure an Position 237 nun nicht mehr dephosphoryliert – und damit inaktiviert – werden könnte. Nun könnte untersucht werden, ob die Zellen aufgrund der vermehrten Aktivität des Tumorsuppressors in ihrem Wachstumsverhalten bzw. Zellüberleben eingeschränkt sind.



**Abbildung 67: Phosphomimetik von Phosphoserin und Asparaginsäure** Aufgrund ihrer negativen Ladung imitiert die Asparaginsäure das phosphorylierte Serin. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hewitt *et al.*<sup>226</sup>

Umgekehrt könnte ein Rescue-Experiment durchgeführt werden, bei dem der Effekt des einen Moleküls durch die Manipulation des anderen Moleküls wieder aufgehoben wird. So könnte man Zellen gestalten, welche gleichzeitig BRD7 und SYK überexprimieren. Eine BRD7-Überexpression hätte eine verringerte Zellproliferation zur Folge, während eine SYK-Überexpression eine gesteigerte Proliferation bedeuten würde. Diese Zellen könnten anschließend mit Zellen verglichen werden, welche nur eine Einzelüberexpression bzw. gar keine Überexpression aufweisen. Sollten die Zellen mit der doppelten Überexpression

im Vergleich zu den Zellen mit singulärer SYK-Überexpression stärker in ihrem Proliferationsverhalten eingeschränkt werden, spricht dies für einen proliferationshemmenden Effekt einer Phosphorylierung von BRD7.

Da BRD7 jedoch nicht direkt *downstream* von SYK im Prä-BZR-Signalweg liegt und viele Interaktionen sowie Abzweigungen im Signalweg existieren, würde es sich hierbei nicht um einen eindeutigen Beweis für die beschriebene Feedback-Schleife handeln.

## **5.5 Schwellenwert für die Toxizität von BRD7**

In dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression als auch der Knockdown von BRD7 in den Prä-B-Zellen RCH-ACV zu einer Abnahme der Viabilität der Zellen führen. Da es sich bei BRD7 um einen Tumorsuppressor handelt, ist es leicht nachvollziehbar, dass eine Überexpression einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen zur Folge hat. Aber auch bei einer verminderten Expression scheint es einen Schwellenwert zu geben, unter dem BRD7 toxisch auf die Zellen wirkt. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde zunächst analysiert, ob dieses Phänomen bereits bei anderen Proteinen in der Literatur beschrieben wurde.

### **5.5.1 *Transcription factor 3 (TCF3)* weist ebenfalls einen Schwellenwert für die Toxizität auf**

Ein solches Protein ist der Transkriptionsfaktor TCF3. TCF3 reguliert die normale Ausreifung der B-Zellen im Keimzentrum und ist quantitativ mehr in den Vorläuferzellen (Zentroblasten) als in ausgereiften Zentrozyten vorhanden. Der Faktor spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms, bei welchem er konstitutiv aktiv exprimiert wird. In Burkitt-Lymphom-Zellen fördert er die Zellproliferation durch die Expression des BZR. Außerdem hemmt er das *PTPN6*-Gen, welches für die Phosphatase SHP1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) kodiert, die die Signaltransduktionseinheit des BZR hemmt. Zusätzlich induziert er jedoch auch die Expression seines eigenen negativen Regulators *DNA-binding protein inhibitor 3 (ID3)*. Schmitz *et al.* erläuterten, dass es denkbar sei, dass dieser negative Feedback-Mechanismus die Ausreifung von Zentroblasten zu Zentrozyten zeitlich taktet,

indem ein vermindertes Vorkommen von TCF3 zum Übergang in Zentrozyten führt.<sup>227</sup> Somit stellt sich die Frage, welches Gleichgewicht an Faktoren ursächlich ist, damit es zur Proliferationsförderung durch TCF3 oder zu seiner eigenen Herunterregulation durch ID3 kommt. Die Regulation in den B-Zelllymphomen findet hierbei überwiegend über Mutationen in den beteiligten Genen statt. Beim *TCF3*-Gen handelt es sich meistens um aktivierende, bei *ID3* um inaktivierende Mutationen.<sup>228</sup> Schmitz *et al.* konnten bereits zeigen, dass in 70 % der Burkitt-Lymphome Mutationen in *TCF*- und *ID3*-Genen vorkommen und dass diese eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms spielen.<sup>229</sup>

Im Gegensatz zu TCF3 handelt es sich bei BRD7 jedoch um einen Tumorsuppressor, der bei einer zu starken Expression negative Effekte auf das Proliferationsverhalten der B-Zellen zur Folge hat. In Analogie zum ID3 bei TCF3 ist es gut vorstellbar, dass es bei BRD7 ebenfalls einen vergleichbaren Regulationsmechanismus geben könnte, der bei einer zu niedrigen BRD7-Expression das Wachstumsverhalten der Zellen einschränken könnte. Es ist vorstellbar, dass ein bestimmter unterer Schwellenwert existiert, unter dem die BRD7-Expression einen negativen Effekt auf die Viabilität der Zellen hat. Es sollte erforscht werden, ob es bei einer Herunterregulation von BRD7 zur Expression von proapoptotischen Molekülen kommt, welche das Gleichgewicht in den Zellen Richtung Apoptose verschieben. Aus diesem Grund sollten in Zukunft Experimente durchgeführt werden, bei denen unterschiedlich viel BRD7 in den Zellen exprimiert wird und dabei der Einfluss auf die Viabilität untersucht wird. Auch könnten Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen eines BRD7-Inhibitors durchgeführt werden. Clark, Vieira *et al.* entwickelten 2015 mit LP99 den ersten selektiven BRD7/9-Inhibitor<sup>230</sup>, der hier zum Einsatz kommen könnte. Alternativ ist es vorstellbar, dass bei einer zu niedrigen Konzentration von BRD7 Proteine gehemmt werden könnten, welche normalerweise die Zellproliferation fördern würden. Diese beiden Hypothesen könnten erklären, warum sowohl die Überexpression als auch der Knockdown von BRD7 das Proliferationsverhalten der RCH-ACV beeinträchtigen.

## 5.5.2 Proapoptotische Wirkungen der Signalwege des Prä-BZR

Vergleichbar wie bei TCF3 zeigt sich das Phänomen, dass ein quantitativ verstärktes Vorkommen eines eigentlich proliferationsfördernden Moleküls zu toxischen Effekten auf das Proliferationsverhalten der Zellen führt, auch bei einer Überaktivierung des Prä-BZR. Dieser Mechanismus wird durch eine Überaktivität von ERK, PI3K und SYK getriggert und hat zur Folge, dass autoreaktive B-Zellen aussortiert werden.<sup>211</sup>

### 5.5.2.1 Pro- und antiapoptotische Wirkung einer Überaktivierung von ERK

Wie unter 1.1.3.2.2 erläutert, konnten Tang *et al.* bereits zeigen, dass eine Aktivierung des ERK-Signalwegs grundsätzlich das Zellwachstum fördert, dass es jedoch unter bestimmten Bedingungen auch zur Apoptoseeinleitung kommen kann. Dieser Aspekt wird gefördert durch das Auftreten DNA-schädigender Stimuli wie beispielsweise die Anwendung einiger Zytostatika oder ionisierender Strahlung.<sup>40,41</sup> Eingeleitet wird die Apoptose durch eine vermehrte Expression des proapoptotischen Faktors Bax, durch die Freisetzung des Hämoproteins Zytochrom c und durch die Aktivierung der Caspase 3.<sup>231</sup> Woessmann *et al.* erläuterten, dass eine ERK-Aktivierung bei Osteosarkomen und beim Neuroblastom eine durch Cisplatin-induzierte Apoptose verstärken kann.<sup>232</sup> Dieser Aspekt könnte erklären, warum auch ein Knockdown von BRD7 mit einer daraus resultierenden erhöhten Konzentration an phosphoryliertem ERK negative Effekte auf das Proliferationsverhalten der Prä-B-Zellen ausübt. In Zukunft sollte untersucht werden, ob die in den hier durchgeführten Experimenten gesetzten Stimuli ausreichend intensiv gewesen waren, um trotz Aktivierung des MEK-Signalwegs das Wachstumsverhalten der Zellen einzuschränken.

Die Klonierung von shRNAs, die für den Knockdown von BRD7 kodierten, führte in RCH-ACV zu einer Überaktivität des ERK-Signalwegs (siehe 4.6.3.2). Außerdem waren die Prä-B-ALL-Zellen in ihrem Wachstumsverhalten eingeschränkt (siehe 4.6.2). Neben der Herunterregulation von BRD7 kann eine Überaktivierung von ERK durch weitere molekulare Signalwege geschehen: Die Phosphatase *Dual specificity phosphatase 6* (DUSP6) stellt einen negativen Regulator von ERK dar. Bei Hemmung von DUSP6 durch *2-benzylidene-3-*

(*cyclohexylamino*)-1-Indanone hydrochloride (BCI) kommt es zur Hyperaktivierung von ERK und zur Apoptoseeinleitung.<sup>233</sup> Ein weiterer negativer Regulator ist die Serin/Threonin-Phosphatase PP2A, welche durch den Inhibitor LB100 gehemmt werden kann.<sup>234</sup> Wie bereits unter 5.1 erläutert, beschrieb Mischen BCI und LB100 als pharmakologische Ansatzpunkte um eine Autoimmunität zu suggerieren und dadurch Leukämiezellen in die Apoptose zu treiben.<sup>211</sup> Außerdem fördern die  $\delta$ -Untereinheit der Proteinkinase C (PKC $\delta$ ) und der Nukleotidaustauschfaktor RasGRP bei einer Überaktivierung von ERK die negative Selektion der Zellen, um so die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern.<sup>235</sup>

Shojaee, Ceaser *et al.* konnten zeigen, dass humane B-Zellen bei Aktivierung von Onkogenen üblicherweise in die Apoptose getrieben werden. Einige Zellen entgehen jedoch dem Zelltod – bei diesen konnte eine Herunterregulation des ERK-Signalwegs festgestellt werden. Bei soliden Tumoren, die von B-Zellen ausgehen, zeigt sich eine Inaktivierung von negativen Regulatoren des ERK-Signalwegs wie Spry2, Dusp6 und Etv5, während diese Moleküle bei Prä-B-Zell-ALL hingegen aktiviert werden.<sup>233</sup> Dies legt den Schluss nahe, dass die von Shojaee, Caeser *et al.* verwendeten entarteten Prä-B-Zellen erst durch Inaktivierung des ERK-Signalwegs proliferieren konnten. Des Weiteren zeigten Stang *et al.*, dass die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bim unterschiedliche Auswirkungen hat, je nachdem, an welcher Position es durch ERK phosphoryliert wird: Phosphorylierungen an Ser44, Thr56 und Ser58 in Exon 3 aktivieren Bim und fördern die negative Selektion der B-Zellen<sup>236</sup>, während eine Phosphorylierung an Ser69 zum proteosomalen Abbau des Proteins führt.<sup>237</sup> Wovon es abhängt, an welcher Position Bim phosphoryliert wird, ist derzeit noch unklar.<sup>211</sup> Aus diesem Grund ist es notwendig, dass in Zukunft weitere Forschung auf diesem Gebiet betrieben wird, um gegebenenfalls therapeutische Schlussfolgerungen ziehen zu können. Es ist denkbar, dass die Position, an welcher die Phosphorylierung stattfindet, abhängig ist von der Menge an phosphoryliertem ERK.

### 5.5.2.2 Proapoptotische Wirkung einer Überaktivierung von AKT

Auch für eine Überaktivität des PI3K-AKT-Signalwegs konnte Mischen eine toxische Wirkung auf Prä-B-ALL-Zellen zeigen<sup>211</sup>: Die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10*) wurde erstmalig 1997 beschrieben. Da es sich dabei um einen negativen Regulator der PI3K handelt, stellt PTEN einerseits einen Tumorsuppressor dar.<sup>238</sup> Andererseits kommt es durch die Hemmung von PTEN durch den selektiven Inhibitor SF1670 (*N-(9,10-Dihydro-9,10-dioxo-2-phenanthrenyl)-2,2-dimethyl-propanamide*) zur Hyperaktivierung von AKT und damit zur Einleitung der Apoptose.<sup>239</sup> Die Erkenntnisse, dass sowohl die Aktivität als auch die Hemmung von PTEN negative Effekte auf das Proliferationsverhalten ausüben, ähneln den Beobachtungen, die wir mit BRD7 machen konnten (siehe 4.4.4 und 4.6.2). Ähnliche Effekte konnten auch mit dem AKT-Agonist SC79 (*2-Amino-6-chloro- $\alpha$ -cyano-3-(ethoxycarbonyl)-4H-1-benzopyran-4-acetic acid ethyl ester*) erzielt werden, der ebenfalls den AKT-Signalweg überaktiviert.<sup>240</sup>

Neben der Inhibition von PTEN induziert auch die Hemmung der Phosphatase SHIP1 (*Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*), bei der es sich ebenfalls um einen negativen Regulator der PI3K handelt, die Apoptose in Prä-B-Zellen.<sup>241</sup> Im Gegensatz dazu fördern diese Veränderungen in reifen B-Zellen das Zellüberleben sowie die Entstehung von Autoimmunität.<sup>242</sup> Auch eine vermehrte Expression der PI3K-Untereinheit p85 $\alpha$  verhindert das weitere Ausreifen der B-Zellen und hat den Zelltod zur Folge.<sup>243</sup> Da die PI3K-Signalwege während der Entwicklung der frühen B-Zelle nur sehr schwach ablaufen, ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der PI3K-Signalweiterleitung abhängig ist vom Stadium der B-Zellreifung.<sup>211</sup>

### 5.5.2.3 Proapoptotische Wirkung einer Überaktivierung der Prä-BZR-proximalen Kinasen SYK und BTK

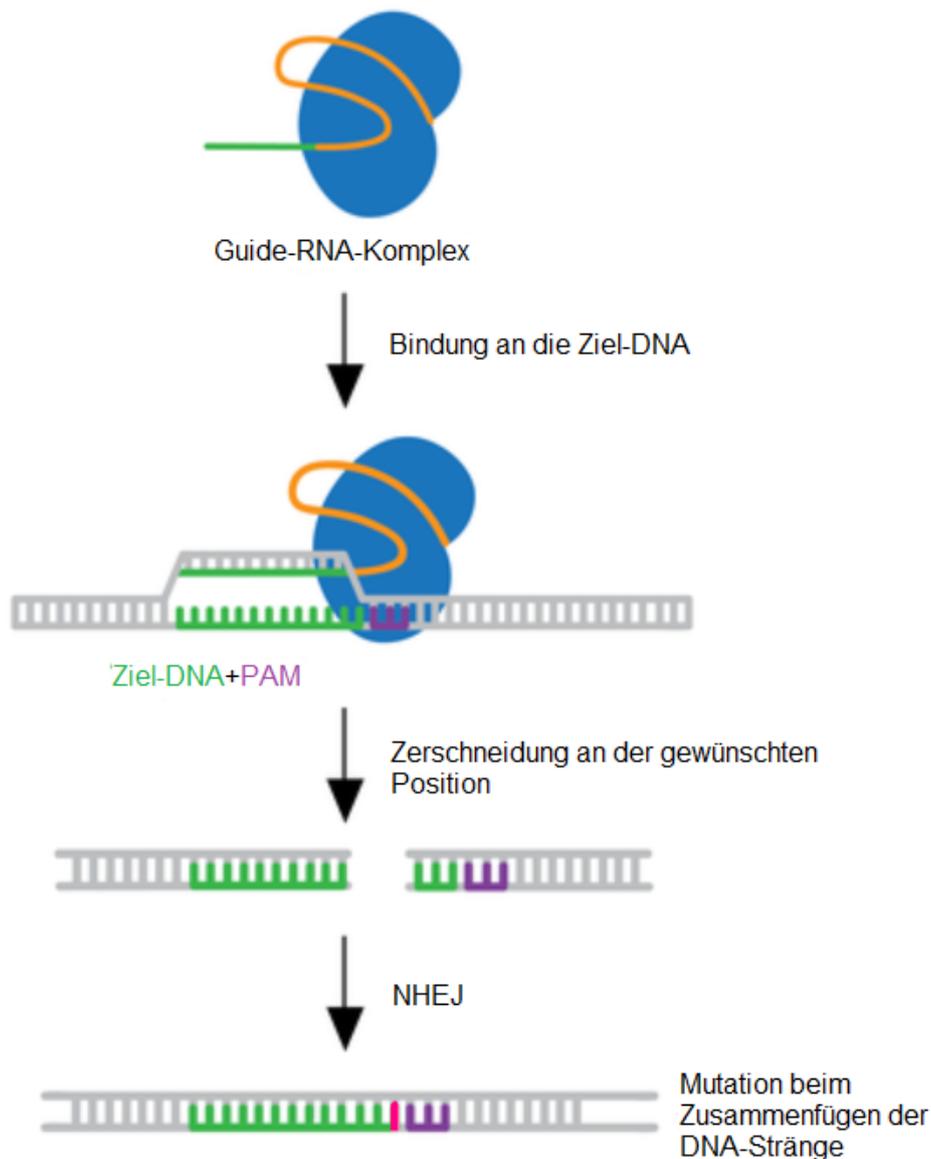
Auf der einen Seite führt eine Überaktivierung von SYK durch die Inhibition der Phosphatase SHP1 in Prä-B-Zellen zum Tod der Zellen. Auch das bereits bei 5.5.2.2 erwähnte SHIP1 hat die gleichen Effekte zur Folge.<sup>208</sup> Besonders die SHIP1-Inhibitoren *3- $\alpha$ -aminocholestane* (3AC)<sup>244</sup> und *(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-androstan-3-amine* (K118)<sup>245</sup> erwiesen sich in Mausmodellen bereits als vielversprechend

für die Apoptoseeinleitung. Auch ein Verlust der Rezeptorgene *Lair1*, *Pecam1* und *Cd300a*, welche in normalen B-Zellen über *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) Signalwege negativ regulieren, führt zu einer verminderten Aktivierung von SHIP1 und SHP1 und resultiert daher in einer gesteigerten Phosphorylierung von SYK. Interessanterweise führt nur eine Phosphorylierung bestimmter Tyrosine – nämlich an Position 352 in der Interdomäne B – zur Einleitung der Apoptose.<sup>208</sup> Eine weitere Möglichkeit, eine Hyperaktivierung von SYK herbeizuführen, ist die Inhibition der Phosphatase PTPN22, welche bei CLL überaktiviert ist und dadurch in der Pathogenese dieser Erkrankung eine negative Selektion von autoreaktiven B-Zellen verhindert.<sup>246</sup> Zur Inhibition von PTPN22 könnte LTV-1 angewandt werden.<sup>247</sup> Ursächlich für die Einleitung des Zelltods durch SYK ist möglicherweise eine Aktivierung der Kinase RIPK1 (*receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1*) über den *Toll-like receptor-* (TLR-) Signalweg.<sup>248</sup>

Auf der anderen Seite kann eine Überaktivierung von SYK auch die Differenzierung der Zellen und die Sekretion von Antikörpern bewirken.<sup>249</sup> Diese Differenzierung in unreife Plasmazellen kann somit autoreaktive B-Zellen vor dem Zelltod bewahren. Vergleichbar mit der Überaktivierung von AKT (siehe 5.5.2.2) führt auch die Überaktivierung von BTK in frühen Stadien der B-Zellentwicklung zur Apoptoseeinleitung, während sich reife, autoreaktive Zellen bei einer konstitutiven BTK-Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren können.<sup>250,251</sup>

### **5.5.3 Klonierung eines Knockouts mittels CRISPR/Cas9**

Ein Experiment, welches tiefere Hinweise auf die Rolle von BRD7 in Prä-B-Zellen liefern könnte, ist die Klonierung eines BRD7-Knockout-Vektors. Im Gegensatz zu dem in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Verfahren der Klonierung eines Knockdowns mittels shRNAs könnte mit diesem Verfahren das Wachstumsverhalten von Tumorzellen komplett ohne den Tumorsuppressor BRD7 untersucht werden.



**Abbildung 68: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Prinzips** Zunächst wird ein so genannter guide-RNA-Komplex gebildet, der mit dem Restriktionsenzym Cas9 einen Ribonukleotidkomplex bildet.<sup>252</sup> Die Spacer-Sequenz (*grün*) der guide-RNA bindet dann an das gewünschte Zielgen, welches an eine *Protospacer Adjacent Motif*- (PAM-)Sequenz (*lila*) angrenzt. Dadurch wird das Restriktionsenzym Cas9 (*blau*) in räumliche Nähe zur Zielsequenz im Genom (*grün*) gebracht. Anschließend wird die DNA an der gewünschten Stelle zerschnitten. Da bei der Verknüpfung mittels *non-homologous endjoining* (NHEJ) Fehler (*pink*) passieren, wird das jeweilige Gen ausgeschaltet (Knockout). Die Abbildung wurde modifiziert nach dem CRISPR Guide von *Addgene*.<sup>253</sup>

Eine Möglichkeit, BRD7 vollständig aus dem Genom zu entfernen, stellt die molekularbiologische Methode CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) dar. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur DNA-Modifikation, welches ursprünglich einen prokaryotischen Verteidigungsmechanismus gegen Viren darstellte. Bei der molekulargenetischen Anwendung lokalisiert die guide-RNA das

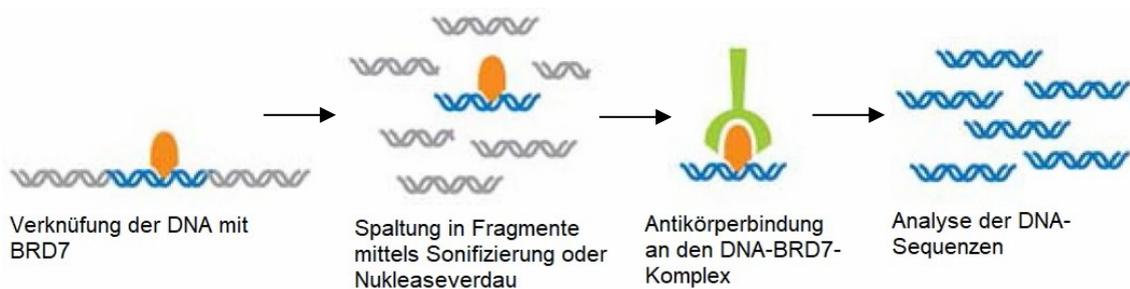
Restriktionsenzym Cas9 an die gewünschte DNA-Sequenz, sodass dieses die Sequenz mithilfe seiner Nukleasedomäne gezielt zerschneiden kann.<sup>252,253</sup> Das Prinzip von CRISPR/Cas9 ist schematisch in Abbildung 68 dargestellt.

## **5.6 Untersuchung der Regulation von Prä-BZR-proximalen Kinasen**

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass eine Überexpression von BRD7 in RCH-ACV einen Einfluss auf das quantitative Vorkommen der Kinasen BTK und SYK hat (siehe Abbildung 59). Um den Prä-BZR-Signalweg sowie BRD7 weiter zu charakterisieren, sollte sich in Zukunft mit der Frage beschäftigt werden, wie BRD7 Prä-BZR-proximale Kinasen reguliert. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte eine Modifikation durch Chromatin-Remodellierung sein. Für BRD7 ist eine Interaktion mit dem *SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex* bereits in der Literatur beschrieben worden.<sup>123</sup> Außerdem haben wir mit dem induzierbaren Vektorsystem erst nach 14 Tagen einen Effekt auf pAKT bzw. pERK feststellen können, was den Schluss nahelegt, dass die Zellen eine längere Zeitperiode benötigen, um sich an die Überexpression von BRD7 anzupassen. Dies bekräftigt unsere These der Modifikation durch Chromatin-Remodellierung, da eine Veränderung im Genom der Zellen mehr Zeit in Anspruch nimmt als beispielsweise eine Modifikation von Transmembran- oder zytoplasmatischen Proteinen.

### **5.6.1 Detektion von Interaktionen zwischen BRD7 und DNA-Abschnitten mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

Um die Genregulation von BRD7 genauer zu untersuchen, könnte eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt werden. Bei diesem Verfahren können Interaktionen zwischen Proteinen und DNA analysiert werden. Eine Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen gibt hierbei den Bereich im Genom an, mit welchem BRD7 assoziiert ist.<sup>254</sup> Kodiert dieser für die PI3K oder andere proximale Kinasen im Prä-BZR-Signalweg, spricht dies für eine Modifikation dieser Kinasen über eine Chromatin-Remodellierung durch BRD7. Das Vorgehen bei der ChIP ist schematisch in Abbildung 69 dargestellt.



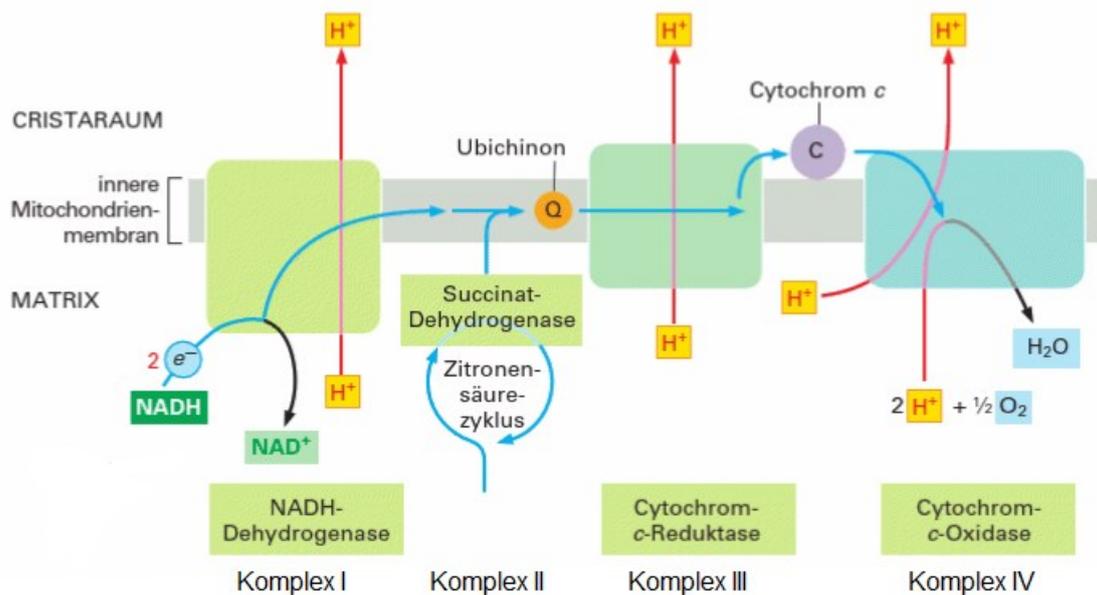
**Abbildung 69: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)** Zunächst findet eine Bindung der DNA an BRD7 mittels UV-Licht oder Formaldehyd statt. Anschließend wird die DNA durch Sonifizierung oder Nukleaseverdau in Fragmente gespalten. Durch Bindung eines Antikörpers an das an die DNA-Sequenzen gebundene BRD7 können nun die Regionen im Genom detektiert werden, die mit BRD7 interagieren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Shah.<sup>255</sup>

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Regulation Prä-BZR-proximaler Kinasen könnte die direkte Interaktion von BRD7 mit der PI3K bzw. mit AKT sein, da für diese Kinasen eine nukleäre Translokation bereits in der Literatur beschrieben wurde.<sup>256</sup> Durch die Translokation in den Kern wird eine räumliche Nähe zu BRD7 geschaffen. Die Verzögerung, mit der die Effekte auftraten, sowie die beschriebene Interaktion mit dem *Chromatin-Remodeling-Complex*<sup>123</sup> machen jedoch eine Modifikation über Chromatin-Remodellierung wahrscheinlicher.

## 5.7 Einfluss von BRD7 auf die Energiegewinnung von Tumorzellen

Bei der Analyse des globalen Proteoms mittels einer massenspektrometrischen Untersuchung wurde nachgewiesen, dass die Komplexe I und III der Atmungskette bei RCH-ACV-Zellen, in denen BRD7 überexprimiert wird, hochreguliert werden (siehe 4.5.6).

Diese Proteinkomplexe sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, weswegen auch die im gleichen Experiment detektierte Hochregulation eines Teils der mitochondrialen Membran zu diesen Ergebnissen kohärent ist. Komplex I und III spielen eine Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung, die auch als Atmungskette bezeichnet wird.<sup>257</sup> Dabei handelt es sich um einen Prozess zur Energiegewinnung, bei welchem Elektronen aus dem Citratzyklus über verschiedene transmembranöse Proteinkomplexe auf Sauerstoff übertragen werden.<sup>258</sup> In Abbildung 70 sind die Vorgänge bei der Atmungskette sowie die vier beteiligten Komplexe schematisch dargestellt.



**Abbildung 70: Schematische Darstellung der bei der Atmungskette ablaufenden Prozesse**  
 Es findet ein Elektronentransport über die vier transmembranösen Komplexe zum Sauerstoff statt. Außerdem dienen Komplex I, III und IV als Protonenpumpen und bauen einen Gradienten auf, der anschließend zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Die Abbildung wurde modifiziert nach Alberts *et al.*<sup>259</sup>

Die Hochregulierung von Atmungskettenkomplexen in BRD7-Überexpressionszellen legt somit den Schluss nahe, dass die oxidative Phosphorylierung in diesen Zellen vermehrt abläuft und somit mehr Energie über die ATP-Synthese gewonnen wird.

Im Gegensatz zu dieser Vermutung stellte Warburg 1956 die These auf, dass die Mitochondrien in allen Tumorzellen beschädigt seien, da diese Zellen unter aeroben Bedingungen vermehrt Glykolyse betrieben und Laktat produzierten. Somit sei die oxidative Phosphorylierung nach Warburgs Auffassung in allen Tumorzellen herunterreguliert.<sup>260</sup> In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Überexpression des Tumorsuppressors BRD7 zu einem Viabilitätsnachteil in den ALL-Zellen führte (siehe 4.4.4). Dass es dennoch in diesen Zellen zu einer Förderung des mitochondrialen Stoffwechsels und der Energiegewinnung durch ATP-Bildung kommt, scheint auf den ersten Blick widersprüchlich. Ashton *et al.* beschrieben jedoch, dass es auch Tumorentitäten bzw. Subgruppen gebe, in denen die oxidative Phosphorylierung hochreguliert sei.<sup>257</sup> Als Beispiele sind Hodgkin-Lymphome<sup>261</sup>, Mammakarzinome<sup>262</sup> sowie bestimmte Unterformen von AML<sup>263</sup> und DLBCL<sup>264</sup> zu nennen. Für diese DLBCL-Subgruppen ist auch eine verminderte Abhängigkeit von den Signalen des BZR beschrieben worden.<sup>264</sup>

Dass BRD7-überexprimierende RCH-ACV-Zellen ein vermindertes Proliferationsverhalten zeigen, lässt die These aufstellen, dass die positiven Effekte einer Hochregulation der mitochondrialen Atmungskette durch die oben beschriebenen negativen Effekte der pAKT-Herunterregulation überwogen werden. Welche molekularen Mechanismen funktionell ablaufen, ist noch nicht im Detail verstanden. Möglicherweise kommt es durch die Überexpression von BRD7 auch zu einer Neuvernetzung (*rewiring*) von Signalwegen, sodass die hier beschriebene Förderung der mitochondrialen Energiegewinnung dennoch zu negativen Effekten auf das Proliferationsverhalten der Zellen führt. Denkbar ist auch, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen um einen Kompensationsmechanismus handelt: In BRD7-überexprimierenden Zellen könnten die Prozesse der oxidativen Phosphorylierung gestört sein, was die Zellen durch eine Hochregulation zu kompensieren versuchen könnten.

Da bei der massenspektrometrischen Untersuchung vermehrt falsch positive Ergebnisse bei Komplex III aufgetreten sind (siehe 4.5.6), sollte der Fokus in weiteren Untersuchungen auf den Komplex I der Atmungskette gelegt werden. Beim Abgleich der mittels Massenspektrometrie ermittelten Anreicherungen mit den Datenbanken *KEGG* und *Reactome* konnte die Hochregulation der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung bestätigt werden.

Der Abgleich mit der Datenbank *GOCC* hat außerdem ergeben, dass die Clathrin-umhüllten endozytotischen Vesikel in BRD7-überexprimierenden Zellen herunterreguliert sind. Die Endozytose von Vesikeln spielt bei vielen zellulären Prozessen wie Signalweiterleitung, Zellernährung und -adhäsion eine wichtige Rolle.<sup>265</sup> Dass es in BRD7-überexprimierenden Zellen zu einer Herunterregulation der für die Endozytose notwendigen Vesikel kommt, könnte sich damit erklären lassen, dass in diesen Zellen die PI3K-Signalwege vermindert ablaufen. Chen *et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Endozytose von Zytokinrezeptoren und dem PI3K-AKT-Signalweg.<sup>266</sup> Endozytotische Vorgänge sind für die Regulation von Signalwegen bedeutsam, da die Internalisierung von Rezeptoren ein vermindertes Ablaufen dieser Signalwege zur Folge hat.<sup>267</sup> Posor *et al.* zeigten außerdem, dass Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PI(3,4)P<sub>2</sub>), welches von der Klasse I der PI3K gebildet wird, die Clathrin-vermittelte Endozytose reguliert. PI(3,4)P<sub>2</sub> wird

benötigt, um das Protein *sorting nexin 9* (SNX9) in der Spätphase der Endozytose anzureichern.<sup>268</sup> Dieses Protein besitzt eine Bindungsstelle für Phosphoinositole und bewirkt die Verengung der Vesikelmembran, bevor sie von der Zellmembran abgekappt wird.<sup>269</sup> Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose insbesondere mit dem PI3K-Signalweg zusammenhängt. Dass in BRD7-überexprimierenden Zellen weniger Proteine gebildet werden, die für die Endozytose der Zellen bedeutsam sind, deckt sich somit mit unseren Beobachtungen, dass in den Überexpressionszellen weniger phosphoryliertes AKT vorhanden ist (siehe Abbildung 52).

Des Weiteren zeigte der Abgleich mit der Datenbank GOCC, dass die MHC (*major histocompatibility complex*) in BRD7-überexprimierenden Zellen weniger stark exprimiert werden. Diese spezialisierten Glykopeptide sind Teil des adaptiven Immunsystems und transportieren fremde Pathogene an die Zelloberfläche, um sie dort den T-Zellen zu präsentieren.<sup>1</sup> Garrido und Aptsiauri erläuterten, dass der Verlust von MHC ein häufig in Tumorzellen auftretendes Phänomen ist, um dem Immunsystem zu entgehen.<sup>270</sup> Dass sie nun in den Zellen herunterreguliert werden, die den Tumorsuppressor BRD7 überexprimieren, erscheint somit kontraintuitiv. Möglicherweise handelt es sich um einen „Rettungsversuch“ der Tumorzellen, da ihr Proliferationsverhalten bereits durch die BRD7-Überexpression eingeschränkt ist und so auf diesem Wege einer weiteren Dezimierung entgangen werden soll.

## **5.8 BRD7 fördert Zellerkennung und -assoziation.**

Bei der Analyse der mittels Massenspektrometrie ermittelten Daten zeigte sich beim Abgleich mit der Datenbank *Reactome*, dass die BRD7-Überexpression zur Hochregulation von Molekülen der Zellerkennung führte (siehe 4.5.6). Bei der Erkennung von Zellen sowie der Anordnung zu Zellverbänden ist es notwendig, dass benachbarte Zellen, mit denen ein Kontakt stattfinden soll, von falschen Interaktionspartnern unterschieden werden können. Dabei spielen Oberflächenmarker wie Glykoproteine eine entscheidende Rolle. Lieberman und Glaser erläuterten, dass das weitere Wachstum von Zellkolonien bei hoher Dichte durch Kontakthemmung blockiert wird.<sup>271</sup> Dies kann insbesondere bei Fibroblasten beobachtet werden. Diese beenden außerdem ihr

Migrationsverhalten, wenn ein Kontakt mit anderen Zellen stattfindet. Diese Phänomene können bei einigen Tumorentitäten hingegen nicht beobachtet werden: Tumorzellen bewegen sich auch nach Berührung von anderen Zellen weiter und führen ihr Zellwachstum fort.<sup>272</sup> Dass diejenigen Proteine, die für Zellerkennung und Assoziation notwendig sind, in BRD7-überexprimierenden Zellen hochreguliert sind, lässt sich möglicherweise damit erklären, dass sie kein unkontrolliertes Tumorzellwachstum mehr betreiben, sondern geordnet mit anderen Zellen in Kontakt treten. Dies wäre kohärent zum Tumorsuppressor-Phänotyp von BRD7. Jedoch sollte beachtet werden, dass das Prinzip der Kontakthemmung bislang nur bei adhärenenten Zellen beschrieben wurde und die Rolle bei Suspensionszellen wie RCH-ACV unklar ist. Interessant ist außerdem, dass das transmembranäre Proteoglykan Syndecan – im Vergleich zu naiven B-Zellen – vermehrt in RCH-ACV-Wildtypzellen exprimiert wird. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung und Zellverbindung.<sup>103</sup> Somit laufen diese Prozesse in den Tumorzellen möglicherweise vermehrt ab um das Tumorwachstum zu fördern.

Des Weiteren zeigten die mit *Reactome* abgeglichenen Daten, dass die MAPK-/ERK-Zielgene wie beispielsweise *microtubule-associated protein (MAP) 1*, Interaktionspartner der Protoonkogene c-Jun und c-Myc sowie der Rezeptor des *platelet-derived-growth-factors*<sup>273</sup> herunterreguliert werden. Dies bestätigt die Beobachtungen, die bei der Durchführung von Western Blots mit BRD7-Überexpressions- und Knockdownzellen gemacht wurden: Der MAPK-Signalweg läuft in BRD7-Überexpressionszellen eingeschränkt ab, da die Phosphorylierung und damit die Aktivität von ERK abnimmt. Umgekehrt ist in Zellen mit BRD7-Knockdown mehr phosphoryliertes ERK vorhanden (siehe Abbildung 65).

## **5.9 Lokalisation von BRD7**

Die Lokalisation eines Proteins ist für seine Funktion essenziell, da beispielsweise die Weiterleitung von Signalkaskaden nur durch räumliche Nähe der Proteine geschehen kann. Zwei Proteine können nur miteinander interagieren, wenn sie sich im gleichen Zellkompartiment befinden.

In dieser Dissertationsarbeit wurden kontroverse Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von BRD7 erzielt: Eine fraktionierte Lyse der Proteine des Vektors,

der für die induzierbare BRD7-Überexpression kodierte, zeigte, dass BRD7 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorkommt (siehe 4.4.5). Im Gegensatz dazu demonstrierte die Fraktionierung der Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven BRD7-Überexpressionsvektor transduziert worden waren, dass das überexprimierte BRD7 nur im Zellkern vorhanden ist (siehe 4.5.4).

Staal *et al.* verdeutlichten mithilfe von Immunfluoreszenz, dass BRD7 überwiegend im Nukleus vorkommt.<sup>125</sup> Ursächlich hierfür ist seine *nuclear localization signal* (NLS)-Sequenz, die eine Translokation in den Kern bewirkt. Zhou *et al.* erläuterten darüber hinaus, dass BRD7 beim Fehlen dieser Sequenz vorwiegend in das Zytoplasma migriert und dann in seiner Fähigkeit den Zellzyklus zu regulieren eingeschränkt ist.<sup>274</sup> Außerdem ist in der Literatur beschrieben worden, dass BRD7 eine Translokation seiner Interaktionspartner in den Zellkern bewirkt: BRD7 fördert die nukleäre Translokation von p85 $\alpha$  und p85 $\beta$ .<sup>275</sup> Eine physiologische Translokation von BRD7 in das Zytoplasma ist hingegen bisher nicht beschrieben worden.

Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass das Ausmaß an BRD7, welches mit dem induzierbaren Vektorsystem erzielt werden konnte, so groß gewesen ist, dass BRD7 aus dem Zellkern in das Zytoplasma migrierte. Kohärent zu dieser These ist, dass sich nur ein geringer Prozentsatz der Zellen induzieren ließ (siehe Abbildung 41). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Menge an BRD7 so hoch gewesen ist, dass viele Zellen sofort in die Apoptose getrieben worden wären, wenn nicht ein Teil des BRD7s in das Zytoplasma migriert wäre. Gegen diese These spricht jedoch, dass die Viabilität der Zellen in diesem Experiment nicht übermäßig stark eingeschränkt gewesen ist, wie es bei einem derartigen Anstieg der Apoptoserate zu erwarten gewesen wäre.

### **5.10 Charakterisierung der Prä-B-Zellen RCH-ACV**

Da BRD7, wie bei 4.5.1 beschrieben, regulierende Effekte auf den PI3K-Signalweg sowie den ERK-Signalweg ausübt, stellt sich die Frage, ob die verwendeten Prä-B-Zellen abhängig von diesen beiden Signalwegen sind. Eine etwaige Abhängigkeit ermöglicht Rückschlüsse darüber, auf welche Weise es durch die Modifikation des BRD7-Expressionsniveaus zu einem

Proliferationsnachteil in diesen Zellen kommt. Außerdem können so mögliche therapeutische Optionen bei Prä-B-Zell-ALL analysiert werden.

RCH-ACV zeigen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1.767 nM eine stärkere Abhängigkeit vom PI3K-Signalweg als die Burkitt-Lymphom-Zellen Daudi ( $IC_{50}$ -Wert von 5.754 nM) (siehe Abbildung 31). Die Zelllinie Daudi ist in der Literatur bereits als sensitiv für eine PI3K-Inhibition beschrieben worden.<sup>189</sup> Auch andere Zelllinien wie die Prä-B-Zellen SMS-SB zeigen eine geringere Abhängigkeit vom PI3K-Signalweg als die RCH-ACV. Aus diesem Grund sollte die Hemmung dieses Signalwegs bei der Suche nach potenziellen therapeutischen Ansatzpunkten bei der Prä-B-Zell-ALL in Betracht gezogen werden.

Levy *et al.* konnten bereits 2009 Effekte mit dem AKT-Inhibitor GSK690693 zeigen.<sup>276</sup> Auch der Inhibitor MK-2206 verminderte die Zellproliferation in B-ALL-Zelllinien und in Patientenproben.<sup>277</sup> Der PI3K-Inhibitor Idelalisib, der bereits bei CLL und follikulären Lymphom zugelassen ist, wird aktuell in klinischen Studien bzgl. eines Einsatzes bei ALL untersucht.<sup>278</sup>

Vom MEK-Signalweg sind RCH-ACV hingegen nicht abhängig, weswegen die bei 4.4.4 beschriebenen Effekte auf die Proliferation der Zellen nicht auf eine Veränderung der Phosphorylierung von ERK1/2 zurückgeführt werden können (siehe 4.1.2.2). Dennoch zeigt sich eine klare, statistisch signifikante Modifikation dieses Signalwegs durch Veränderung der Expression von BRD7 in Prä-B-Zellen. Dies wirft die Frage auf, welche molekularen Folgen die Veränderung der ERK-Expression in den Prä-B-Zellen bewirkt. Denkbar ist, dass zusätzlich noch andere Effektoren modifiziert werden müssen, damit die Regulation des ERK-Signalwegs einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat.

Aufgrund ihrer Bedeutung in einigen Leukämieformen sowie bei der Ausreifung der B-Zellen sollten die Prä-B-Zellen in Zukunft tiefergehend untersucht und charakterisiert werden. Die Abhängigkeit dieser Zellen vom PI3K-Signalweg konnte in dieser Dissertationsarbeit gezeigt werden (siehe 4.1.1.2). Da ihre jeweiligen Rezeptoren essenziell für die Signalwege sowie die weitere Zellreifung sind, ist es bedeutsam, den genauen molekularen Rezeptoraufbau zu studieren. Um spezifische Oberflächenmarker auf unterschiedlichen Zelllinien zu detektieren, könnten FACS-Assays durchgeführt werden, bei denen der

extrazelluläre Teil des Prä-BZRs mittels Antikörper angefärbt wird. Beispielsweise könnten Antikörper verwendet werden, die gegen die Ersatzleichten Ketten  $\lambda 5$  (CD179B) oder VpreB (CD179A) gerichtet sind. So könnte untersucht werden, ob einer dieser für Prä-B-Zellen typischen Oberflächenmarker in den jeweiligen Leukämiezellen quantitativ reguliert wird. Insbesondere sollten hierbei die Unterschiede der beiden Prä-B-Zelllinien RCH-ACV und SMS-SB analysiert werden, da gezeigt werden konnte, dass in SMS-SB deutlich weniger BRD7 exprimiert wird als in RCH-ACV. So sollte im Besonderen auf den Einfluss von BRD7 auf diese beiden Zelllinien eingegangen werden und die auftretenden Effekte auch in weiteren Zelllinien studiert werden. Durch die genaue Charakterisierung der unterschiedlichen Subtypen von Prä-B-Zellen können dann für unterschiedliche Untergruppen der ALL optimale Therapiekonzepte erarbeitet werden.

### **5.11 BRD7 als therapeutischer Ansatzpunkt bei der Prä-B-Zell-ALL**

Diese Dissertationsarbeit bestätigt noch einmal, dass der Prä-BZR einen wichtigen Kontrollpunkt in der B-Zellausreifung darstellt und er, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, als therapeutischer Ansatzpunkt bei der Prä-B-Zell-ALL angewandt werden sollte.

Da BRD7 Teil des Prä-BZR-Signalwegs ist, sollten die Folgen einer Modifikation des BRD7-Niveaus für die RCH-ACV untersucht werden: BRD7 zeigte bei Überexpression einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen (siehe 4.4.4). Außerdem ist eine indirekte Steigerung des Signals von BRD7 durch eine Hemmung des Prä-BZR-Signalwegs bzw. des PI3K-Signalwegs möglich. Eine der vielen Konsequenzen der Prä-BZR-Hemmung stellt die bei 5.4 beschriebene Feedback-Schleife dar, welche somit unterbrochen werden würde. Die dadurch induzierte Steigerung des Signals des Tumorsuppressors könnte somit zu einem verminderten Wachstum der entarteten Zellen bei ALL beitragen. Dies hätte zur Folge, dass die Zahl der Blasten im Knochenmark nicht weiter ansteigen würde.

Die BRD7-Überexpression führte zu antiproliferativen Effekten, jedoch wurden die Zellen nicht in die Apoptose getrieben. Um auch bereits vorhandene Blasten abzutöten, wäre daher eine alleinige Ansteuerung von BRD7 für eine suffiziente

ALL-Therapie nicht ausreichend. *In vivo* würde es jedoch gar nicht zu einer singulären Modifikation von BRD7 kommen, da es vielfältige Signalwege und Mechanismen gibt, über die BRD7, der Prä-BZR sowie der PI3K-Signalweg miteinander verbunden sind (siehe 5.4). Aus diesem Grund würde aus einer Überexpression von BRD7 gleichzeitig auch eine Hemmung des PI3K-Signalwegs resultieren und umgekehrt. Diese Inhibition des Signalwegs und insbesondere eine Verminderung der Phosphorylierung der Kinase AKT stößt in Prä-B-Zellen prinzipiell die Apoptose an. BRD7 trägt sicherlich zu diesem Effekt bei, jedoch scheint der Einfluss beispielsweise im Vergleich zur PI3K-Hemmung nur gering zu sein. Dadurch, dass bei Überexpression und beim Knockdown von BRD7 keine gesteigerte Apoptose beobachtet werden konnte, scheint BRD7 nur die beschriebenen Signalwege zu unterstützen, jedoch selbst nicht genug Effekt zu haben, um die Apoptose einzuleiten.

Aufgrund der negativen Effekte auf die Proliferation der Zellen kann BRD7 in Zukunft prinzipiell als therapeutischer Ansatzpunkt bei der Prä-B-Zell-ALL in Betracht gezogen werden. Es stellt sich jedoch nun die Frage, wie dies im Patienten umgesetzt werden kann. Da eine Überexpression von BRD7 negative Effekte auf das Proliferationsverhalten der Prä-B-Zellen gezeigt hatte, wäre es notwendig, eine Möglichkeit zu finden, seine Signalwirkung zu verstärken. Eine gezielte Phosphorylierung, welche eine konstitutive Aktivierung von BRD7 zur Folge hätte, könnte prinzipiell durch das Designen von Kinasen geschehen, welche die gewünschte Proteinsequenz erkennen. Der Einsatz von solchen Kinasen ist jedoch im Patienten nur schwer realistisch umsetzbar. Denkbar wäre der Einsatz von Inhibitoren, welche an regulierenden Proteinen ansetzen, die für eine Inhibition dieser beschriebenen Kinasen verantwortlich sind. Durch eine Hemmung der Inhibition von BRD7-phosphorylierenden Proteinen könnte so eine gesteigerte Phosphorylierung erreicht werden. Insgesamt ist über die Regulation von BRD7 sowie die beteiligten Kinasen noch wenig bekannt: Hu, Wu *et. al* konnten zeigen, dass eine Polyribosilierung von BRD7 durch die Poly-ADP-Ribose Polymerase PARP-1 zu dessen Degeneration führt.<sup>279</sup> Außerdem wird die Expression von BRD7 durch DNA-Methylierung in der Promotorregion<sup>280</sup> bzw. den Einsatz von microRNA vermindert.<sup>281</sup> Eine Komplexbildung von BRD7 mit dem *Anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C) führt beim Osteosarkom

zum Abbau von BRD7.<sup>132</sup> Durch die gezielte Hemmung dieser genannten Strukturen könnte eine vermehrte Expression von BRD7 erreicht werden. Des Weiteren konnten Liu, Zhou *et al.* bei Nasopharynxkarzinomzellen zeigen, dass das Regulatorgen *c-myc* die Expression von BRD7 vermindert und dass ein Knockdown von *c-myc* das mRNA-Level von BRD7 steigert. Außerdem bewirkt die Bindung des Transkriptionsfaktor Sp1 eine leichte Hochregulation der BRD7-Expression.<sup>282</sup> Falls diese Signalwege und Mechanismen in ALL-Zellen bestätigt werden könnten, wären dies denkbare Ansatzpunkte, um eine BRD7-Überexpression therapeutisch zu nutzen.

Im Hinblick auf die bei 4.6.2 beschriebene Proliferationshemmung bei einem Knockdown von BRD7 wäre prinzipiell auch der Einsatz eines BRD7-Inhibitors denkbar. Als Beispiele sind hier LP99, der erste selektive BRD7/9-Inhibitor,<sup>230</sup> oder Sunitinib, welcher bereits klinisch eingesetzt wird<sup>283</sup>, zu nennen. Da jedoch durch die gleichzeitig bewirkte Steigerung der Phosphorylierung von AKT und ERK wachstumsfördernde Signalwege angestoßen werden und die detektierten Effekte nur gering ausgefallen sind, stellt eine Inhibition von BRD7 meiner Einschätzung nach keinen effektiven therapeutischen Ansatzpunkt dar.

Zusammenfassend spielt BRD7 somit in die proliferationshemmenden und apoptosefördernden Effekte einer Prä-BZR-Inhibition mit hinein, jedoch stellt der Einsatz von weiter *upstream* ansetzenden Kinaseinhibitoren einen effektiveren therapeutischen Ansatzpunkt dar: Eine Inhibition von BTK durch Ibrutinib wird bereits therapeutisch bei refraktärer Prä-B-Zell-ALL angewandt.<sup>284</sup> Auch AKT- bzw. PI3K-Inhibitoren befinden sich bereits in klinischer Erprobung (siehe 5.10). Zur Inhibition von SYK wurde in unserer Arbeitsgruppe der Inhibitor PRT062607 verwendet. Dabei handelt es sich um einen sehr selektiven Inhibitor mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1 nM (siehe 1.4). Er zeigt in Maus-Modellen eine ca. 70-prozentige Inhibition von SYK.<sup>285</sup> In einigen malignen hämatologischen Erkrankungen sowie bei Autoimmunerkrankungen wird die Inhibition von SYK bereits als therapeutischer Ansatzpunkt genutzt.<sup>286</sup> Fostamatinib war der erste SYK-Inhibitor, der oral eingesetzt werden konnte.<sup>287</sup> Aktuell wird an weiteren SYK-Inhibitoren mit gutem *in vivo*-Ansprechen bei hämatologischen Erkrankungen und mit niedrigem Nebenwirkungsprofil geforscht. Entospletinib ist ein SYK-Inhibitor der zweiten Generation und zeigte in klinischen Studien bereits Erfolge

bei CLL.<sup>286</sup> Bei akuter myeloischer Leukämie werden Entospletinib und der SYK-Inhibitor TAK-659 bereits erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt.<sup>288,289</sup> In einigen Prä-B-ALL-Zelllinien führte Entospletinib *in vitro* zu proapoptotischen Effekten.<sup>290</sup> Köhrer *et al.* konnten *in vivo* bei ALL Ergebnisse mit dem SYK-Inhibitor PRT318 erzielen. Außerdem führte eine Inhibition über PRT06018 und Fostamatinib ebenfalls zur Einleitung der Apoptose in den Prä-B-Zellen<sup>106</sup>. 2014 beschrieben Uckun *et al.* den Inhibitor C61, der gegen die SYK-Bindungsstelle gerichtet ist, als vielversprechendes therapeutisches Molekül bei refraktärer B-Vorläuferzell-Leukämie<sup>291</sup> – insbesondere zeigten sich additive Effekte bei gleichzeitiger niedrigdosierter Ganzkörperbestrahlung.<sup>292</sup>

Die molekularen Vorgänge, die durch BRD7 angestoßen werden, sind noch immer nicht vollständig verstanden. Dazu kohärent ist auch die Beobachtung, dass BRD7 in naiven B-Zellen weniger exprimiert wird als in den Prä-B-Zellen RCH-ACV (siehe 4.3). Dies erscheint kontraintuitiv, da es sich bei BRD7 um einen Tumorsuppressor handelt und man vermuten würde, dass in Tumorzellen weniger Tumorsuppressor vorhanden ist als in naiven B-Zellen. Diese Beobachtung legt daher den Schluss nahe, dass das in RCH-ACV vermehrt exprimierte BRD7 funktionell inaktiviert wird und so die beschriebenen antiproliferativen Effekte, die BRD7 bei einer Überexpression hervorruft, weniger stark bzw. gar nicht auftreten.

Insgesamt präsentiert sich BRD7 aufgrund seines Tumorsuppressor-Phänotyps als vielversprechendes Zielmolekül im Prä-BZR-Signalweg. Da sowohl eine Überexpression als auch ein Knockdown von BRD7 das Proliferationsverhalten der Prä-B-Zellen RCH-ACV einschränken und eine (hypothetische) Feedback-Schleife zwischen BRD7, dem Prä-BZR und dem PI3K-Signalweg besteht, stellt BRD7 ein interessantes Effektormolekül bei der Prä-B-Zell-ALL dar.

## 6 Zusammenfassung

Die Entartung von B-Zellen stellt den Ursprung vieler maligner Erkrankungen dar. Bei der Prä-B-Zell-ALL, welche 15 % der malignen Erkrankungen im Kindesalter ausmacht, findet die Entartung auf der Entwicklungsstufe der Prä-B-Zellen statt. In der normalen Hämatopoese fungiert der Prä-BZR als Kontrollpunkt in der Entwicklung der B-Zellen, weshalb der Rezeptor sowie die von ihm ausgehenden Signalwege bereits bei vielen hämatologischen Neoplasien als therapeutische Ansatzpunkte in Betracht gezogen wurden.

Der Prä-BZR selbst stellt einen Tumorsuppressor dar: Etwa 13,5 % der Prä-B-Zell-ALL sind von einem aktiven Prä-BZR-Signal abhängig. In entarteten Zellen findet oftmals eine Imitation der Proliferationssignale eines konstitutiv aktiven BZR statt. Bei Zellen ohne einen funktionellen Rezeptor führt die Rekonstruktion des Rezeptors jedoch zum Zelltod. Sowohl ein zu hohes als auch ein zu niedriges Aktivitätsniveau des Prä-BZR haben somit einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen zur Folge.

Wichtige *downstream* des Prä-BZR vorkommende Effektormoleküle sind die Histonmethyltransferase DOT1L und der Tumorsuppressor BRD7. DOT1L interagiert mit dem Transkriptionsfaktor AF10, der eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung von *Mixed-lineage*-Leukämien spielt; eine DOT1L-Inhibition zeigt daher auch nur bei MLL-rearrangierten Leukämien therapeutische Effekte.

In dieser Dissertationsarbeit konnte der Tumorsuppressorphänotyp von BRD7 aufgezeigt werden. Außerdem zeigten sich Effekte auf den PI3K- sowie den MEK-Signalweg durch Dephosphorylierung der Kinasen AKT und ERK. Dieser Aspekt kann mithilfe einer hypothetischen Feedback-Schleife zwischen BRD7, dem PI3K-Signalweg sowie dem Prä-BZR erklärt werden. BRD7 und Gene des PI3K-Signalwegs könnten hierbei über Chromatin-Remodellierung miteinander interagieren. Die Analyse der Phosphosite von BRD7 stellt einen essenziellen Aspekt dar, um diese Feedback-Schleife experimentell zu validieren.

Auf der anderen Seite führte auch die Inaktivierung von BRD7 zu negativen Effekten auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Ähnlich wie der Transkriptionsfaktor TCF3, der einen oberen Schwellenwert besitzt, könnte BRD7 einen unteren Schwellenwert besitzen, unter welchem

wachstumshemmende Effekte hervorgerufen werden. Außerdem sind auch proapoptotische Wirkungen für eine Überaktivierung des ERK- und des AKT-Signalwegs beschrieben worden, beispielsweise über die Hemmung des AKT-Inhibitors PTEN.

Durch massenspektrometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von BRD7 die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette hochreguliert. Die proliferationshemmenden Effekte des PI3K-Signalwegs überwiegen jedoch vermutlich diese positiven Effekte auf die Energiegewinnung der Tumorzellen. Alternativ könnte es sich in den Tumorzellen lediglich um einen Kompensationsmechanismus bei geschädigter oxidativer Phosphorylierung handeln.

Bei der Analyse der molekularen Hintergründe des Wachstumsnachteils der BRD7-überexprimierenden Zellen konnte festgestellt werden, dass die Prä-B-Zellen RCH-ACV vom PI3K-Signalweg, jedoch nicht vom MEK-Signalweg abhängig sind. Es ist denkbar, dass noch weitere Moleküle reguliert werden müssen, damit die Modifikation des MEK-Signalwegs Effekte auf das Wachstumsverhalten und Überleben der Zellen ausübt.

In dieser Arbeit konnten der Prä-BZR und die von ihm ausgehenden Signalwege als gute Ansatzpunkte bei der Therapie der Prä-B-Zell-ALL identifiziert werden. Zwar zeigten sich bei Überexpression und Inhibition von BRD7 nur Effekte auf die Proliferation der Zellen, jedoch existieren vielfältige Interaktionen mit *upstream* lokalisierten Signalmolekülen (hypothetische Feedback-Schleife). Die dadurch angestoßenen Signalwege können zur Einleitung der Apoptose beitragen. Prinzipiell könnte der Tumorsuppressor BRD7 therapeutisch durch das Designen von Kinasen eingesetzt werden, welche eine gezielte Phosphorylierung und damit konstitutive Aktivierung von BRD7 bewirken, jedoch stellt der Einsatz von etablierten, weiter *upstream* ansetzenden Kinase-Inhibitoren einen effektiveren therapeutischen Ansatzpunkt zur Apoptoseeinleitung im Patienten dar.

## 7 Abstract

Acute lymphoblastic leukemia derives from progenitor cells of b-cells. Pre-b-cell ALL accounts for 15% of malignancies in childhood. Due to the pre-b-cell receptor role as a checkpoint in the development of b-cells, pre-bcr and its signaling pathways have already been used as a therapeutical target in ALL for years.

The pre-bcr acts as a tumor suppressor and 13.5% of all pre-b-cell ALL depends on pre-bcr signaling. Imitation of the proliferation signals of a functional bcr often takes place in malignant cells. However, reconstitution of the pre-bcr in cells lacking a functional receptor leads to induction of apoptosis. Overactivation as well as deficient activation levels show negative effects on cell proliferation.

Histone methyltransferase DOT1L and regulator protein BRD7 are crucial proteins downstream of the pre-bcr. DOT1L interacts with the transcription factor AF10, which plays an important role in the pathogenesis of mixed lineage leukemia. Hence, inhibition of DOT1L displayed effects in MLL rearranged cells only.

In this thesis we were able to reveal the tumor suppressor phenotype of BRD7. BRD7 overexpression decreased pAKT and pERK levels and inhibited cell proliferation. These effects are due to a hypothetical feedback loop between the pre-bcr, BRD7 and the PI3K signaling pathway. It is possible that interaction between BRD7 and PI3K genes works via chromatin remodeling. To validate this feedback loop, the phosphosite of BRD7 should be further investigated.

Nevertheless, knockdown of BRD7 also led to restricted cell proliferation while phosphorylation of AKT and ERK was enhanced. It is possible that BRD7 limits cell growth when it falls below a certain threshold – similar to the known upper threshold of the transcription factor TCF3. Furthermore, it is described that hyperactivation of MEK and AKT signaling pathways also induces apoptosis – e.g. via inhibition of PTEN, an inhibitor of AKT.

Mass spectrometry analysis showed enhanced expression of proteins of the respiratory chain in BRD7 overexpressing cells. The negative effects of a decreased activation of the PI3K signaling pathway though will probably outweigh the impact of the oxidative phosphorylation. Furthermore, it could also be a compensation mechanism of an impaired respiratory chain.

Analysis of molecular pathways showed that the pre-b-cells RCH-ACV depend on PI3K signaling but not MEK signaling. Regulation of additional proteins may affect proliferation and survival when inhibiting the MEK signaling pathways.

All in all, the results of this thesis support the fact that pre-bcr and its signaling pathways are crucial targets in therapy of pre-b-cell-ALL. Overexpression or inhibition of BRD7 only affected proliferating cells. However, due to diverse interactions like the mentioned feedback loop, apoptosis may be induced as well. Regarding its tumor suppressor phenotype, BRD7 can theoretically be used as a therapeutical target in pre-b-cell ALL. By designing kinases, it could be phosphorylated and therefore constitutively activated, but in vivo the use of well-established kinase inhibitors against the pre-bcr signaling pathways might be more realistic.

## Literaturverzeichnis

1. Murphy KP, Travers P, Walport M, et al. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
2. Cooper MD. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):191-197. doi:10.1038/nri3801.
3. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):959-971. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046.
4. Patel AJ, Richter A, Drayson MT, Middleton GW. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2020. doi:10.1007/s00262-019-02461-2.
5. Ding T, Yan F, Cao S, Ren X. Regulatory B cell: New member of immunosuppressive cell club. *Hum Immunol*. 2015;76(9):615-621. doi:10.1016/j.humimm.2015.09.006.
6. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2001;167(2):1081-1089. doi:10.4049/jimmunol.167.2.1081.
7. Reth M, Nielsen P. Chapter Four - Signaling Circuits in Early B-Cell Development. In: Alt FW, ed. *Advances in Immunology*. Vol. 122. Academic Press; 2014:129-175.
8. Krangel MS. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol*. 2003;4(7):624-630. doi:10.1038/ni0703-624.
9. Roth DB. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6). doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.
10. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(3):223-261. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.11.003.
11. Sakaguchi N, Melchers F. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature*. 1986;324(6097):579-582. doi:10.1038/324579a0.
12. Mårtensson IL, Ceredig R. Review article: role of the surrogate light chain and the pre-B-cell receptor in mouse B-cell development. *Immunology*. 2000;101(4):435-441. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00151.x.
13. Winkler TH, Mårtensson I-L. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front Immunol*. 2018;9:2423. doi:10.3389/fimmu.2018.02423.
14. Gathings WE, Lawton AR, Cooper MD. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol*. 1977;7(11):804-810. doi:10.1002/eji.1830071112.
15. Tsai D-Y, Hung K-H, Chang C-W, Lin K-I. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):64. doi:10.1186/s12929-019-0558-1.
16. Kreer C, Gruell H, Mora T, Walczak AM, Klein F. Exploiting B Cell Receptor Analyses to Inform on HIV-1 Vaccination Strategies. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(1). doi:10.3390/vaccines8010013.
17. Asma GE, van den Langlois Bergh R, Vossen JM. Development of pre-B and B lymphocytes in the human fetus. *Clin Exp Immunol*. 1984;56(2):407-414.

18. Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*. 2015;94(3):193-205. doi:10.1111/ejh.12427.
19. Eswaran J, Sinclair P, Heidenreich O, et al. The pre-B-cell receptor checkpoint in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1623-1631. doi:10.1038/leu.2015.113.
20. Melchers F, Boekel E ten, Seidl T, et al. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev*. 2000;175:33-46.
21. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):195-205. doi:10.1038/nri2491.
22. Marshall AJ, Fleming HE, Wu GE, Paige CJ. Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *J Immunol*. 1998;161(11):6038-6045.
23. Kawano Y, Ouchida R, Wang J-Y, et al. A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosome-associated protein transmembrane 5. *Mol Cell Biol*. 2012;32(21):4462-4471. doi:10.1128/MCB.00531-12.
24. Ohnishi K, Melchers F. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol*. 2003;4(9):849-856. doi:10.1038/ni959.
25. Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(8):578-591. doi:10.1038/nri3487.
26. Iacobucci I. Targeting precursor BCR signaling in ALL. *Blood*. 2017;129(9):1062-1064. doi:10.1182/blood-2017-01-760504.
27. Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, van Obberghen E. Mechanism of Protein Kinase B Activation by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4989-5000.
28. Maehama T, Dixon JE. The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13375-13378. doi:10.1074/jbc.273.22.13375.
29. Coffey PJ, WOODGETT JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*. 1991;201(2):475-481. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16305.x.
30. Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, et al. Akt, a Target of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Inhibits Apoptosis in a Differentiating Neuronal Cell Line. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):2143-2152.
31. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases. *Cell*. 2000;103(2):227-238. doi:10.1016/S0092-8674(00)00115-X.
32. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 1998;17(11 Reviews):1395-1413. doi:10.1038/sj.onc.1202174.
33. Oh-hora M, Johmura S, Hashimoto A, Hikida M, Kurosaki T. Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med*. 2003;198(12):1841-1851. doi:10.1084/jem.20031547.

34. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
35. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, et al. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*. 1991;10(4):885-892.
36. Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Böhm M, MacKiewicz A, Behrmann I. Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem J*. 2001;357(Pt 1):297-303.
37. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 2):2371s-2375s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2539.
38. Wang H-G, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 Targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. *Cell*. 1996;87(4):629-638. doi:10.1016/S0092-8674(00)81383-5.
39. Norris JL, Baldwin AS. Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem*. 1999;274(20):13841-13846. doi:10.1074/jbc.274.20.13841.
40. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*. 2006;58(11):621-631. doi:10.1080/15216540600957438.
41. Tang D, Wu D, Hirao A, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12710-12717. doi:10.1074/jbc.M111598200.
42. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2002;15(4):597-621. doi:10.1053/beh.2002.0224.
43. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012;119(1):34-43. doi:10.1182/blood-2011-04-347872.
44. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-3734. doi:10.1182/blood-2010-05-282632.
45. Bennett JC. A CASE OF ACUTE LYMPHATIC LEUKÆMIA. *Can Med Assoc J*. 1939;40(4):386.
46. Chan KW. Acute lymphoblastic leukemia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2002;32(2):40-49. doi:10.1067/mps.2002.121790.
47. Schaller J. Arthritis as a presenting manifestation of malignancy in children. *The Journal of Pediatrics*. 1972;81(4):793-797. doi:10.1016/S0022-3476(72)80108-2.
48. Gökbüget N, Baldus C, Brüggemann M, Hauswirth AW, Schanz U. Akute lymphatische Leukämie (ALL): C91.00. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@@view/html/index.html#litID0ESFAG>. Accessed November 13, 2018.
49. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458.
50. AWMF. Akute lymphoblastische Leukämie - ALL - im Kindesalter: S1-Leitlinie. [AWMF-Register Nr. 025/014]. Updated 04.2016.

51. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
52. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-396. doi:10.1182/asheducation-2012.1.389.
53. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1982;60(4):864-871.
54. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;86(11):4263-4269.
55. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML-1 fusion gene. its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;122(2):73-78.
56. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-480. doi:10.1056/NEJMoa0808253.
57. Propp S, Lizzi FA. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 1970;36(3):353-360.
58. Nowell, P. C., and D. A. Hungerford. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132.
59. Burmeister T, Schwartz S, Taubald A, et al. Atypical BCR-ABL mRNA transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007;92(12):1699-1702. doi:10.3324/haematol.11737.
60. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(3):393-410. doi:10.1309/AJCPAN7BH5DNYWZB.
61. Wetzler M, Dodge RK, Mrózek K, et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood*. 1999;93(11):3983-3993.
62. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, Menezes RX de, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology*. 2009;10(2):125-134. doi:10.1016/S1470-2045(08)70339-5.
63. Hayashi Y, Sugita K, Nakazawa S, et al. Karyotypic patterns in acute mixed lineage leukemia. *Leukemia*. 1990;4(2):121-126.
64. Mirro J, Zipf TF, Pui CH, et al. Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Blood*. 1985;66(5):1115-1123.
65. Collins EC, Rabbitts TH. The promiscuous MLL gene links chromosomal translocations to cellular differentiation and tumour tropism. *Trends in Molecular Medicine*. 2002;8(9):436-442. doi:10.1016/S1471-4914(02)02397-3.
66. Frei E, Bentzel CJ, Rieselbach R, Block JB. Renal complications of neoplastic disease. *Journal of Chronic Diseases*. 1963;16(7):757-776. doi:10.1016/0021-9681(63)90010-9.
67. Cairo MS, Bishop M. Tumour lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification. *Br J Haematol*. 2004;127(1):3-11. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05094.x.

68. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5):v69-v82. doi:10.1093/annonc/mdw025.
69. Engelhardt M, Berger DP, Mertelsmann R, Duyster J, eds. *Das Blaue Buch: Chemotherapie-Manual Hämatologie und Onkologie.* 6th ed. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer; 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-51420-7>.
70. Miller CB, Zehnbauser BA, Piantadosi S, Rowley SD, Jones RJ. Correlation of occult clonogenic leukemia drug sensitivity with relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood.* 1991;78(4):1125-1131.
71. Nair R, Gheith S, Popescu D, Agostino NM. A rare case of acute lymphoblastic leukemia in a patient with light chain (AL) amyloidosis treated with lenalidomide. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):2683-2689.
72. Conter V, Aricò M, Basso G, et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(2):255-264. doi:10.1038/leu.2009.250.
73. Mörücke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia.* 2010;24(2):265-284. doi:10.1038/leu.2009.257.
74. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia.* 2000;14(12):2205-2222.
75. Pulte D, Jansen L, Gondos A, et al. Survival of adults with acute lymphoblastic leukemia in Germany and the United States. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e85554. doi:10.1371/journal.pone.0085554.
76. Vilmer E, Suci S, Ferster A, et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. Children Leukemia Cooperative Group. *Leukemia.* 2000;14(12):2257-2266.
77. Ferster A, Benoit Y, Francotte N, et al. Treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. Children Leukemia Cooperative Group--EORTC. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood.* 2000;95(8):2729-2731.
78. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood.* 2007;109(3):926-935. doi:10.1182/blood-2006-01-024729.
79. Kaleita TA, Reaman GH, MacLean WE, Sather HN, Whitt JK. Neurodevelopmental outcome of infants with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group report. *Cancer.* 1999;85(8):1859-1865.
80. Forman SJ, O'Donnell MR, Nademanee AP, et al. Bone marrow transplantation for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1987;70(2):587-588.
81. Wheeler KA, Richards SM, Bailey CC, et al. Bone marrow transplantation versus chemotherapy in the treatment of very high-risk childhood acute

- lymphoblastic leukemia in first remission: results from Medical Research Council UKALL X and XI. *Blood*. 2000;96(7):2412-2418.
82. Aur RJ, Simone J, Hustu HO, et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood*. 1971;37(3):272-281.
  83. Pui C-H, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2730-2741. doi:10.1056/NEJMoa0900386.
  84. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1038-1042. doi:10.1056/NEJM200104053441402.
  85. Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, et al. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*. 2002;100(6):1965-1971. doi:10.1182/blood-2001-12-0181.
  86. K.G. Roberts, Y. Li, D. Payne-Turner, R.C. Harvey, Y.-L. Yang, D. Pei, K. McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfort, M. Rusch, S.-C. Chen, J. Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R.S. Fulton, J. Wen, M. Valentine, C. Cheng, S.W. Paugh, M. Devidas, I.-M. Chen, S. Reshmi, A. Smith, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau, B. Vadodaria, H. Mulder, N.J. Winick, E.C. Larsen, W.L. Carroll, N.A. Heerema, A.J. Carroll, G. Grayson, S.K. Tasian, A.S. Moore, F. Keller, M. Frei-Jones, J.A. Whitlock, E.A. Raetz, D.L. White, T.P. Hughes, J.M. Guidry Auvil, M.A. Smith, G. Marcucci, C.D. Bloomfield, K. Mrózek, J. Kohlschmidt, W. Stock, S.M. Kornblau, M. Konopleva, E. Paietta, C.-H. Pui, S. Jeha, M.V. Relling, W.E. Evans, D.S. Gerhard, J.M. Gastier-Foster, E. Mardis, R.K. Wilson, M.L. Loh, J.R. Downing, S.P. Hunger, C.L. Willman, J. Zhang, C.G. Mullighan. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1005. doi:10.1056/NEJMoa1403088.
  87. Topp MS, Gökbuğet N, Stein AS, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2015;16(1):57-66. doi:10.1016/S1470-2045(14)71170-2.
  88. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38. doi:10.1126/scitranslmed.3005930.
  89. Hucks G, Rheingold SR. The journey to CAR T cell therapy: the pediatric and young adult experience with relapsed or refractory B-ALL. *Blood Cancer J*. 2019;9(2):10. doi:10.1038/s41408-018-0164-6.
  90. Vogler LB, Crist WM, Bockman DE, Pearl ER, Lawton AR, Cooper MD. Pre-B-cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1978;298(16):872-878. doi:10.1056/NEJM197804202981603.
  91. Brouet JC, Preud'homme JL, Penit C, Valensi F, Rouget P, Seligmann M. Acute lymphoblastic leukemia with pre-B-cell characteristics. *Blood*. 1979;54(1):269-273.

92. Miller DR, Miller LP. Acute lymphoblastic leukemia in children: An update of clinical, biological, and therapeutic aspects. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1990;10(2):131-164. doi:10.1016/1040-8428(90)90004-C.
93. Crist W, Boyett J, Roper M, et al. Pre-B cell leukemia responds poorly to treatment: a pediatric oncology group study. *Blood*. 1984;63(2):407-414.
94. Crist W, Boyett J, Jackson J, et al. Prognostic importance of the pre-B-cell immunophenotype and other presenting features in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1989;74(4):1252-1259.
95. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-1421. doi:10.1126/science.8197455.
96. Bunting KD. STAT5 signaling in normal and pathologic hematopoiesis. *Front Biosci*. 2007;12:2807-2820. doi:10.2741/2274.
97. Li S, Couvillon AD, Brasher BB, van Etten RA. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J*. 2001;20(23):6793-6804. doi:10.1093/emboj/20.23.6793.
98. Jack I, Seshadri R, Garson M, et al. RCH-ACV: a lymphoblastic leukemia cell line with chromosome translocation 1;19 and trisomy 8. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;19(3-4):261-269.
99. Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*. 1984;63(3):721-724.
100. McWhirter JR, Neuteboom STC, Wancewicz EV, Monia BP, Downing JR, Murre C. Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(20):11464-11469. doi:10.1073/pnas.96.20.11464.
101. Thorsteinsdottir U, Kros J, Kroon E, Haman A, Hoang T, Sauvageau G. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):6355-6366. doi:10.1128/MCB.19.9.6355.
102. Curry J d., Glaser MC, Smith MT. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection and quantification of t(1;19) (E2A-PBX1) fusion genes associated with leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(4):826-830. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03190.x.
103. Leibniz Institut DSMZ. RCH-ACV. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-548.html>. Accessed August 8, 2018.
104. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14713-14720. doi:10.1074/jbc.272.23.14713.
105. Takata M, Sabe H, Hata A, et al. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO J*. 1994;13(6):1341-1349.
106. Köhrer S, Havranek O, Seyfried F, et al. Pre-BCR Signaling In Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1, and MYC,

- and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia*. 2016;30(6):1246-1254. doi:10.1038/leu.2016.9.
107. Coffey G, DeGuzman F, Inagaki M, et al. Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;340(2):350-359. doi:10.1124/jpet.111.188441.
  108. Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, et al. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998;150(2):613-632.
  109. van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. Dot1p Modulates Silencing in Yeast by Methylation of the Nucleosome Core. *Cell*. 2002;109(6):745-756. doi:10.1016/S0092-8674(02)00759-6.
  110. Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P. Characterization of the grappa Gene, the *Drosophila* Histone H3 Lysine 79 Methyltransferase. *Genetics*. 2005;169(1):173-184. doi:10.1534/genetics.104.033191.
  111. Ooga M, Inoue A, Kageyama S, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice. *Biol Reprod*. 2008;78(3):413-424. doi:10.1095/biolreprod.107.063453.
  112. Jones B, Su H, Bhat A, et al. The Histone H3K79 Methyltransferase Dot1L Is Essential for Mammalian Development and Heterochromatin Structure. *PLoS Genet*. 2008;4(9). doi:10.1371/journal.pgen.1000190.
  113. Kim W, Choi M, Kim J-E. The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle. *Cell Cycle*. 2014;13(5):726-738. doi:10.4161/cc.28104.
  114. Okada Y, Feng Q, Lin Y, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 2005;121(2):167-178. doi:10.1016/j.cell.2005.02.020.
  115. Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, et al. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood*. 2013;122(6):1017-1025. doi:10.1182/blood-2013-04-497644.
  116. Feng Y, Yang Y, Ortega MM, et al. Early mammalian erythropoiesis requires the Dot1L methyltransferase. *Blood*. 2010;116(22):4483-4491. doi:10.1182/blood-2010-03-276501.
  117. Kim W, Kim R, Park G, Park J-W, Kim J-E. Deficiency of H3K79 Histone Methyltransferase Dot1-like Protein (DOT1L) Inhibits Cell Proliferation\*. *J Biol Chem*. 2011;287(8):5588-5599. doi:10.1074/jbc.M111.328138.
  118. Vos D de, Frederiks F, Terweij M, et al. Progressive methylation of ageing histones by Dot1 functions as a timer. *EMBO Rep*. 2011;12(9):956-962. doi:10.1038/embor.2011.131.
  119. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, et al. brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 1992;68(3):561-572.
  120. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. 1999;399(6735):491-496. doi:10.1038/20974.
  121. Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, Dawid IB. The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(10):2603.

122. Drost J, Mantovani F, Tocco F, et al. BRD7 is a candidate tumour suppressor gene required for p53 function. *Nat Cell Biol.* 2010;12(4):380-389. doi:10.1038/ncb2038.
123. Kaeser MD, Aslanian A, Dong M-Q, Yates JR, Emerson BM. BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32254-32263. doi:10.1074/jbc.M806061200.
124. Zhou J, Ma J, Zhang B-C, et al. BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1-S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways. *J Cell Physiol.* 2004;200(1):89-98. doi:10.1002/jcp.20013.
125. Staal A, Enserink JM, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ. Molecular characterization of Celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2. *J Cell Physiol.* 2000;185(2):269-279. doi:10.1002/1097-4652(200011)185:2<269:AID-JCP12>3.0.CO;2-L.
126. Kim S, Lee J, Park J, Chung J. BP75, bromodomain-containing M(r) 75,000 protein, binds dishevelled-1 and enhances Wnt signaling by inactivating glycogen synthase kinase-3 beta. *Cancer Res.* 2003;63(16):4792-4795.
127. Kzhyshkowska J, Rusch A, Wolf H, Dobner T. Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain-containing protein BRD7. *Biochem J.* 2003;371(Pt 2):385-393. doi:10.1042/BJ20021281.
128. Harte MT, O'Brien GJ, Ryan NM, et al. BRD7, a subunit of SWI/SNF complexes, binds directly to BRCA1 and regulates BRCA1-dependent transcription. *Cancer Res.* 2010;70(6):2538-2547. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2089.
129. Yu Y, Zhu S, Zhang B, Zhou M, Li X, Li G. Screening of BRD7 interacting proteins by yeast two-hybrid system. *Sci China, C, Life Sci.* 2002;45(5):546-552. doi:10.1360/02yc9060.
130. Wu W-J, Hu K-S, Chen D-L, et al. Prognostic relevance of BRD7 expression in colorectal carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(2):131-140. doi:10.1111/eci.12024.
131. Yu X, Li Z, Shen J. BRD7: a novel tumor suppressor gene in different cancers. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):742-748.
132. Hu K, Liao D, Wu W, et al. Targeting the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)- bromodomain containing 7 (BRD7) pathway for human osteosarcoma. *Oncotarget.* 2014;5(10):3088-3100.
133. Wang H, Zhao R, Guo C, et al. Knockout of BRD7 results in impaired spermatogenesis and male infertility. *Sci Rep.* 2016;6:21776. doi:10.1038/srep21776.
134. Tae S, Karkhanis V, Velasco K, et al. Bromodomain protein 7 interacts with PRMT5 and PRC2, and is involved in transcriptional repression of their target genes. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(13):5424-5438. doi:10.1093/nar/gkr170.
135. Uniprot. Retinoblastoma-like protein 2. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q64700>. Accessed January 13, 2020.
136. Shailesh H, Zakaria ZZ, Baiocchi R, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer. *Oncotarget.* 2018;9(94):36705-36718. doi:10.18632/oncotarget.26404.

137. Uniprot. Protein arginine N-methyltransferase 5. <https://www.uniprot.org/uniprot/O14744>. Updated January 13, 2020.
138. Moritz LE, Trievel RC. Structure, mechanism, and regulation of polycomb-repressive complex 2. *J Biol Chem*. 2018;293(36):13805-13814. doi:10.1074/jbc.R117.800367.
139. Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, et al. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep*. 2013;5(6):1704-1713. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.020.
140. Selleckchem. LY294002: Catalog No.S1105; Synonyms: SF 1101, NSC 697286. <https://www.selleckchem.com/products/LY294002.html>. Accessed February 21, 2020.
141. Selleckchem. Trametinib (GSK1120212): Catalog No.S2673; Synonyms: JTP-74057. <https://www.selleckchem.com/products/gsk1120212-jtp-74057.html>. Accessed February 21, 2020.
142. Fulwyler MJ. Status quo in flow-through cytometry. *J Histochem Cytochem*. 1974;22(7):605-606. doi:10.1177/22.7.605.
143. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-805.
144. Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(25):11899-11903. doi:10.1073/pnas.92.25.11899.
145. Wahlfors J, Loimas S, Pasanen T, Hakkarainen T. Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochem Cell Biol*. 2001;115(1):59-65. doi:10.1007/s004180000219.
146. Boris-Lawrie KA, Temin HM. Recent advances in retrovirus vector technology. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1993;3(1):102-109. doi:10.1016/s0959-437x(05)80349-1.
147. Szymczak AL, Vignali DAA. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(5):627-638. doi:10.1517/14712598.5.5.627.
148. Monash university. Fortessa X20a - Fluorescence Detection Map. [https://www.monash.edu/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/958660/fortessa-x20a-detector-chart.pdf](https://www.monash.edu/__data/assets/pdf_file/0007/958660/fortessa-x20a-detector-chart.pdf). Accessed July 17, 2020.
149. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*. 1995;184(1):39-51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-I.
150. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(2):204-208. doi:10.1002/cyto.990130216.
151. Herault O, Colombat P, Domenech J, et al. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. *Br J Haematol*. 1999;104(3):530-537.
152. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*. 1928;27(2):113-159.

153. Lennox ES. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. 1955;1(2):190-206. doi:10.1016/0042-6822(55)90016-7.
154. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. 1996;272(5259):263-267. doi:10.1126/science.272.5259.263.
155. Malim MH, Hauber J, Fenrick R, Cullen BR. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature*. 1988;335(6186):181-183. doi:10.1038/335181a0.
156. DuBridghe RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):379-387. doi:10.1128/MCB.7.1.379.
157. Gama-Norton L, Botezatu L, Herrmann S, et al. Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(10):1269-1279. doi:10.1089/hum.2010.143.
158. Ramezani A, Hawley RG. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol*. 2002;Chapter 16:Unit 16.21. doi:10.1002/0471142727.mb1621s60.
159. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol*. 1996;70(4):2581-2585. doi:10.1128/JVI.70.4.2581-2585.1996.
160. Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:Unit 10.13. doi:10.1002/0471142735.im1013s31.
161. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
162. Maizel JV. Acrylamide-Gel Electrophorograms by Mechanical Fractionation: Radioactive Adenovirus Proteins. *Science*. 1966;151(3713):988-990. doi:10.1126/science.151.3713.988.
163. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*. 1984;1:41-55. doi:10.1385/0-89603-062-8:41.
164. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0.
165. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(1):4-25. doi:10.1111/sms.12702.
166. Burnette W. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195-203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5.
167. Bio-Rad, ed. *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell - Instruction Manual*. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>. Accessed July 14, 2020.
168. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1312:17-30. doi:10.1007/978-1-4939-2694-7\_5.

169. DeCaprio J, Kohl TO. Immunoprecipitation. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017;2017(12):pdb.prot098640. doi:10.1101/pdb.prot098640.
170. Bonifacino JS, Gershlick DC, Dell'Angelica EC. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol.* 2016;71. doi:10.1002/cpcb.3.
171. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Wu R, ed. *Recombinant DNA*. Vol. 155. San Diego, Calif. [u.a.]: Academic Press; 1987:335-350. *Methods in Enzymology*; 155.
172. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. *Natl Med J India.* 1992;5(3):115-119.
173. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology.* 1970;53(1):159-162. doi:10.1016/0022-2836(70)90051-3.
174. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of Escherichia coli by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(8):2110-2114. doi:10.1073/pnas.69.8.2110.
175. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-417.
176. Christian A. Heid, Junko Stevens, Kenneth J. Livak. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research.* 1996;(6):986-994.
177. Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR 1: The Comparative CT Method ( $\Delta\Delta$  CT Method).
178. Kienitz H. *Massenspektrometrie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 1968.
179. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics.* 2015;15(18):3175-3192. doi:10.1002/pmic.201500108.
180. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(9):699-711. doi:10.1038/nrm1468.
181. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246(4926):64-71. doi:10.1126/science.2675315.
182. Dr. Hagen Trommer. Die Massenspektrometrie. <http://www.storckverlag.de/wp-content/uploads/2012/05/Fortbildung-2010-07-08-Massenspektrometrie.pdf>. Accessed August 3, 2020.
183. R A, M M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928). doi:10.1038/nature01511.
184. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010;190(4):491-500. doi:10.1083/jcb.201004052.
185. Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000;72(6):1156-1162. doi:10.1021/ac991131p.
186. Alliance of genome resources. Geneontology: GO enrichment analysis. <http://geneontology.org/docs/go-enrichment-analysis/>.
187. Kanehisa Laboratories. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Accessed July 10, 2020.
188. Elixir. reactome: Find Reactions, Proteins and Pathways. <https://reactome.org/>. Updated July 14, 2020.

189. Mori T, Sairenji T. Functional role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on cell growth and lytic cycle of Epstein-Barr virus in the Burkitt's lymphoma cell line, P3HR-1. *Virus Genes*. 2006;32(3):327-334. doi:10.1007/s11262-005-6918-9.
190. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, et al. MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell*. 2011;20(1):66-78. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010.
191. Smith RG, Dev VG, Shannon WA. Characterization of a novel human pre-B leukemia cell line. *J Immunol*. 1981;126(2):596-602.
192. Fischer EH, KEG. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem*. 1955;216:121-132.
193. BD Pharmingen™. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I: Technical Data Sheet. <https://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/559763.pdf>. Accessed January 6, 2021.
194. Chiu Y-H, Lee JY, Cantley LC. BRD7, a tumor suppressor, interacts with p85alpha and regulates PI3K activity. *Mol Cell*. 2014;54(1):193-202. doi:10.1016/j.molcel.2014.02.016.
195. The M, Tasnim A, Käll L. How to talk about protein-level false discovery rates in shotgun proteomics. *Proteomics*. 2016;16(18):2461-2469. doi:10.1002/pmic.201500431.
196. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
197. Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, Yokota H, eds. *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, NY, s.l.: Springer New York; 2013.
198. Müschen M. Rationale for targeting the pre-B-cell receptor signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(24):3688-3693. doi:10.1182/blood-2015-01-567842.
199. Geng H, Hurtz C, Lenz KB, et al. Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2015;27(3):409-425. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.003.
200. Shapiro-Shelef M, Lin K-I, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 Is Required for the Formation of Immunoglobulin Secreting Plasma Cells and Pre-Plasma Memory B Cells. *Immunity*. 2003;19(4):607-620. doi:10.1016/S1074-7613(03)00267-X.
201. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. PRDM1/BLIMP1: a tumor suppressor gene in B and T cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1223-1228. doi:10.3109/10428194.2014.953155.
202. Tolomeo M, Meli M, Grimaudo S. STAT5 and STAT5 Inhibitors in Hematological Malignancies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(17):2036-2046. doi:10.2174/1871520619666190906160848.
203. Mangum DS, Downie J, Mason CC, et al. VPRED1 deletions occur independent of lambda light chain rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(1):216-220. doi:10.1038/leu.2013.223.
204. Klein F, Feldhahn N, Harder L, et al. The BCR-ABL1 kinase bypasses selection for the expression of a pre-B cell receptor in pre-B acute

- lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 2004;199(5):673-685. doi:10.1084/jem.20031637.
205. Trageser D, Iacobucci I, Nahar R, et al. Pre-B cell receptor-mediated cell cycle arrest in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia requires IKAROS function. *J Exp Med*. 2009;206(8):1739-1753. doi:10.1084/jem.20090004.
206. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2003;423(6938):452-456. doi:10.1038/nature01608.
207. Kersseboom R, Middendorp S, Dingjan GM, et al. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *J Exp Med*. 2003;198(1):91-98. doi:10.1084/jem.20030615.
208. Chen Z, Shojaee S, Buchner M, et al. Signaling thresholds and negative B cell selection in acute lymphoblastic leukemia. *Nature*. 2015;521(7552):357-361. doi:10.1038/nature14231.
209. Tretter T, Ross AE, Dordai DI, Desiderio S. Mimicry of pre-B cell receptor signaling by activation of the tyrosine kinase Blk. *J Exp Med*. 2003;198(12):1863-1873. doi:10.1084/jem.20030729.
210. Feldhahn N, Klein F, Mooster JL, et al. Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 2005;201(11):1837-1852. doi:10.1084/jem.20042101.
211. Müschen M. Autoimmunity checkpoints as therapeutic targets in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):103-116. doi:10.1038/nrc.2017.111.
212. Pindolia VK, Zarowitz BJ. Imatinib mesylate, the first molecularly targeted gene suppressor. *Pharmacotherapy*. 2002;22(10):1249-1265. doi:10.1592/phco.22.15.1249.33482.
213. Buchner M, Swaminathan S, Chen Z, Müschen M. Mechanisms of pre-B-cell receptor checkpoint control and its oncogenic subversion in acute lymphoblastic leukemia. *Immunol Rev*. 2015;263(1):192-209. doi:10.1111/imr.12235.
214. Duy C, Hurtz C, Shojaee S, et al. BCL6 enables Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition. *Nature*. 2011;473(7347):384-388. doi:10.1038/nature09883.
215. Naqvi K, Verstovsek S, Kantarjian H, Ravandi F. A potential role of ruxolitinib in leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20(8):1159-1166. doi:10.1517/13543784.2011.589383.
216. Weledji EP. Benefits and risks of splenectomy. *Int J Surg*. 2014;12(2):113-119. doi:10.1016/j.ijssu.2013.11.017.
217. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45. doi:10.1038/47412.
218. Stein EM, Garcia-Manero G, Rizzieri DA, et al. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. *Blood*. 2018;131(24):2661-2669. doi:10.1182/blood-2017-12-818948.
219. Klaus CR, Iwanowicz D, Johnston D, et al. DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350(3):646-656. doi:10.1124/jpet.114.214577.

220. Crews CM, Erikson RL. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):8205-8209. doi:10.1073/pnas.89.17.8205.
221. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577. doi:10.1038/bcj.2017.53.
222. Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J*. 2017;36(1):1-6. doi:10.1007/s10930-017-9696-z.
223. Thorsness PE, Koshland DE. Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem*. 1987;262(22):10422-10425.
224. Pearlman SM, Serber Z, Ferrell JE. A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell*. 2011;147(4):934-946. doi:10.1016/j.cell.2011.08.052.
225. Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*. 2001;2(10):769-779. doi:10.1038/35093556.
226. Hewitt SL, Wong JB, Lee J-H, et al. The Conserved ATM Kinase RAG2-S365 Phosphorylation Site Limits Cleavage Events in Individual Cells Independent of Any Repair Defect. *Cell Rep*. 2017;21(4):979-993. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.084.
227. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(2). doi:10.1101/cshperspect.a014282.
228. Zayac AS, Olszewski AJ. Burkitt lymphoma: bridging the gap between advances in molecular biology and therapy. *Leuk Lymphoma*. 2020;61(8):1784-1796. doi:10.1080/10428194.2020.1747068.
229. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-120. doi:10.1038/nature11378.
230. Clark PGK, Vieira LCC, Tallant C, et al. LP99: Discovery and Synthesis of the First Selective BRD7/9 Bromodomain Inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(21):6217-6221. doi:10.1002/anie.201501394.
231. Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, et al. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol*. 2005;25(5):374-382. doi:10.1002/jat.1081.
232. Woessmann W, Chen X, Borkhardt A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50(5):397-404. doi:10.1007/s00280-002-0502-y.
233. Shojaee S, Caeser R, Buchner M, et al. Erk Negative Feedback Control Enables Pre-B Cell Transformation and Represents a Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015;28(1):114-128. doi:10.1016/j.ccell.2015.05.008.
234. Hong CS, Ho W, Zhang C, Yang C, Elder JB, Zhuang Z. LB100, a small molecule inhibitor of PP2A with potent chemo- and radio-sensitizing potential. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(6):821-833. doi:10.1080/15384047.2015.1040961.

235. Limnander A, Depeille P, Freedman TS, et al. STIM1, PKC- $\delta$  and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development. *Nat Immunol.* 2011;12(5):425-433. doi:10.1038/ni.2016.
236. Stang SL, Lopez-Campistrous A, Song X, et al. A proapoptotic signaling pathway involving RasGRP, Erk, and Bim in B cells. *Exp Hematol.* 2009;37(1):122-134. doi:10.1016/j.exphem.2008.09.008.
237. Luciano F, Jacquel A, Colosetti P, et al. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene.* 2003;22(43):6785-6793. doi:10.1038/sj.onc.1206792.
238. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-1947. doi:10.1126/science.275.5308.1943.
239. Li Y, Prasad A, Jia Y, et al. Pretreatment with phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibitor SF1670 augments the efficacy of granulocyte transfusion in a clinically relevant mouse model. *Blood.* 2011;117(24):6702-6713. doi:10.1182/blood-2010-09-309864.
240. Jo H, Mondal S, Tan D, et al. Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(26):10581-10586. doi:10.1073/pnas.1202810109.
241. Shojaee S, Chan LN, Buchner M, et al. PTEN opposes negative selection and enables oncogenic transformation of pre-B cells. *Nat Med.* 2016;22(4):379-387. doi:10.1038/nm.4062.
242. O'Neill SK, Getahun A, Gauld SB, et al. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity.* 2011;35(5):746-756. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.011.
243. Deau M-C, Heurtier L, Frange P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest.* 2014;124(9):3923-3928. doi:10.1172/JCI75746.
244. Brooks R, Fuhler GM, Iyer S, et al. SHIP1 inhibition increases immunoregulatory capacity and triggers apoptosis of hematopoietic cancer cells. *J Immunol.* 2010;184(7):3582-3589. doi:10.4049/jimmunol.0902844.
245. Srivastava N, Iyer S, Sudan R, et al. A small-molecule inhibitor of SHIP1 reverses age- and diet-associated obesity and metabolic syndrome. *JCI insight.* 2016;1(11). doi:10.1172/jci.insight.88544.
246. Negro R, Gobessi S, Longo PG, et al. Overexpression of the autoimmunity-associated phosphatase PTPN22 promotes survival of antigen-stimulated CLL cells by selectively activating AKT. *Blood.* 2012;119(26):6278-6287. doi:10.1182/blood-2012-01-403162.
247. Vang T, Liu WH, Delacroix L, et al. LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK. *Nat Chem Biol.* 2012;8(5):437-446. doi:10.1038/nchembio.916.
248. Gurung P, Fan G, Lukens JR, Vogel P, Tonks NK, Kanneganti T-D. Tyrosine Kinase SYK Licenses MyD88 Adaptor Protein to Instigate IL-1 $\alpha$ -Mediated Inflammatory Disease. *Immunity.* 2017;46(4):635-648. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.014.
249. Getahun A, Beavers NA, Larson SR, Shlomchik MJ, Cambier JC. Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is

- required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. *J Exp Med*. 2016;213(5):751-769. doi:10.1084/jem.20150537.
250. Maas A, Dingjan GM, Grosveld F, Hendriks RW. Early arrest in B cell development in transgenic mice that express the E41K Bruton's tyrosine kinase mutant under the control of the CD19 promoter region. *J Immunol*. 1999;162(11):6526-6533.
251. Kersseboom R, Kil L, Flierman R, et al. Constitutive activation of Bruton's tyrosine kinase induces the formation of autoreactive IgM plasma cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2643-2654. doi:10.1002/eji.201040521.
252. Perez Rojo F, Nyman RKM, Johnson AAT, et al. CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*. 2018;9(1):214-221. doi:10.1080/21655979.2018.1470720.
253. Addgene. CRISPR 101: A Desktop Resource: Chapter 3: Using CRISPR in your experiments. <https://www.addgene.org/guides/crispr/>. Accessed June 9, 2020.
254. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTechniques*. 2004;37(6):961-969. doi:10.2144/04376RV01.
255. Anjali Shah. Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) on the SOLiD™ system. *Nat Methods*. 2009;6(4):ii-iii. doi:10.1038/nmeth.f.247.
256. Davis WJ, Lehmann PZ, Li W. Nuclear PI3K signaling in cell growth and tumorigenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:24. doi:10.3389/fcell.2015.00024.
257. TM A, WG M, LA K-S, GS H. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3070.
258. MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-148. doi:10.1038/191144a0.
259. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 2017. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4856334>.
260. O W. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191). doi:10.1126/science.123.3191.309.
261. Birkenmeier K, Dröse S, Wittig I, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. *Int J Cancer*. 2016;138(9):2231-2246. doi:10.1002/ijc.29934.
262. Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, et al. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle*. 2011;10(23):4047-4064. doi:10.4161/cc.10.23.18151.
263. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(3):329-341. doi:10.1016/j.stem.2012.12.013.
264. Caro P, Kishan AU, Norberg E, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2012;22(4):547-560. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.014.
265. M K, A R. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5). doi:10.1038/nrm.2017.132.

266. Chen P, Yao H, Huang LJ. Cytokine Receptor Endocytosis: New Kinase Activity-Dependent and -Independent Roles of PI3K. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8. doi:10.3389/fendo.2017.00078.
267. Anderson DH. Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog Lipid Res*. 2006;45(2):102-119. doi:10.1016/j.plipres.2005.12.003.
268. Posor Y, Eichhorn-Gruenig M, Puchkov D, et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*. 2013;499(7457):233-237. doi:10.1038/nature12360.
269. Kurten RC, Cadena DL, Gill GN. Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science*. 1996;272(5264):1008-1010. doi:10.1126/science.272.5264.1008.
270. Garrido F, Aptsiauri N. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. *Immunology*. 2019;158(4):255-266. doi:10.1111/imm.13114.
271. MA L, L G. Density-dependent regulation of cell growth: an example of a cell-cell recognition phenomenon. *The Journal of membrane biology*. 1981;63(1-2). doi:10.1007/BF01969440.
272. Ribatti D. A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp Cell Res*. 2017;359(1):17-19. doi:10.1016/j.yexcr.2017.06.012.
273. Guo Y-J, Pan W-W, Liu S-B, Shen Z-F, Xu Y, Hu L-L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007. doi:10.3892/etm.2020.8454.
274. Zhou M, Liu H, Xu X, et al. Identification of nuclear localization signal that governs nuclear import of BRD7 and its essential roles in inhibiting cell cycle progression. *J Cell Biochem*. 2006;98(4):920-930. doi:10.1002/jcb.20788.
275. Park SW, Herrema H, Salazar M, et al. BRD7 regulates XBP1s' activity and glucose homeostasis through its interaction with the regulatory subunits of PI3K. *Cell Metab*. 2014;20(1):73-84. doi:10.1016/j.cmet.2014.04.006.
276. Levy DS, Kahana JA, Kumar R. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood*. 2009;113(8):1723-1729. doi:10.1182/blood-2008-02-137737.
277. Neri LM, Cani A, Martelli AM, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014;28(4):739-748. doi:10.1038/leu.2013.226.
278. Adam E, Kim HN, Gang EJ, et al. The PI3K $\delta$  Inhibitor Idelalisib Inhibits Homing in an in Vitro and in Vivo Model of B ALL. *Cancers (Basel)*. 2017;9(9). doi:10.3390/cancers9090121.
279. Hu K, Wu W, Li Y, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of BRD7 by PARP1 confers resistance to DNA-damaging chemotherapeutic agents. *EMBO Rep*. 2019;20(5). doi:10.15252/embr.201846166.
280. Liu H, Zhang L, Niu Z, et al. Promoter methylation inhibits BRD7 expression in human nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2008;8(1). doi:10.1186/1471-2407-8-253.
281. Park Y-A, Lee J-W, Choi J-J, et al. The interactions between MicroRNA-200c and BRD7 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):125-133. doi:10.1016/j.ygyno.2011.09.026.
282. Liu H, Zhou M, Luo X, et al. Transcriptional regulation of BRD7 expression by Sp1 and c-Myc. *BMC Mol Biol*. 2008;9(1):111. doi:10.1186/1471-2199-9-111.

283. Karim RM, Chan A, Zhu J-Y, Schönbrunn E. Structural Basis of Inhibitor Selectivity in the BRD7/9 Subfamily of Bromodomains. *J Med Chem.* 2020;63(6):3227-3237. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01980.
284. Kim E, Hurtz C, Koehrer S, et al. Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood.* 2017;129(9):1155-1165. doi:10.1182/blood-2016-06-722900.
285. Selleckchem. PRT062607 (P505-15) HCl: Catalog No.S8032; Synonyms: BIIB057. <https://www.selleckchem.com/products/prt062607-p505-15-hcl.html>. Accessed February 26, 2020.
286. Liu D, Mamorska-Dyga A. Syk inhibitors in clinical development for hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):145. doi:10.1186/s13045-017-0512-1.
287. Rolf MG, Curwen JO, Veldman-Jones M, et al. In vitro pharmacological profiling of R406 identifies molecular targets underlying the clinical effects of fostamatinib. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(5):e00175. doi:10.1002/prp2.175.
288. Walker AR, Byrd JC, Bhatnagar B, Mims AS, Lin T, Croswell HE, et al. Association 2018. Results of a phase 1B/2 study of Entospletinib (GS-9973) Monotherapy and in Combination with Induction Chemotherapy in newly diagnosed Patients with Acute Myeloid: Abstract S118. 23th Annual Meeting of the European Hematology.
289. Kaplan JB, Bixby DL, Morris JC, et al. a Phase 1b/2 Study of TAK-659, an Investigational Dual SYK and FLT-3 Inhibitor, in Patients (Pts) with Relapsed or Refractory Acute Myelogenous Leukemia (R/R AML). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016;128(22):2834. doi:10.1182/blood.V128.22.2834.2834.
290. Sender S, Sekora A, Villa Perez S, et al. Precursor B-ALL Cell Lines Differentially Respond to SYK Inhibition by Entospletinib. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2). doi:10.3390/ijms22020592.
291. Uckun FM, Qazi S. SYK as a New Therapeutic Target in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Cancer Ther.* 2014;5(1):124-131. doi:10.4236/jct.2014.51015.
292. Uckun FM, Myers DE, Cheng J, Qazi S. Liposomal Nanoparticles of a Spleen Tyrosine Kinase P-Site Inhibitor Amplify the Potency of Low Dose Total Body Irradiation Against Aggressive B-Precursor Leukemia and Yield Superior Survival Outcomes in Mice. *EBioMedicine.* 2015;2(6):554-562. doi:10.1016/j.ebiom.2015.04.005.